

**CISPLATIN - INDUZIerte VERÄNDERUNGEN
ZELLKINETISCHER EIGENSCHAFTEN
VON ZELLEN IN VITRO**

JOHANNA HEINLE

1986

Aus dem Institut für Hämatologie, Abteilung für
Experimentelle Hämatologie, der Gesellschaft für
Strahlen- und Umweltforschung mbH München

Vorstand: Prof. Dr. med. P. Dörmer

CISPLATIN - INDUZIERTE VERÄNDERUNGEN

ZELLKINETISCHER EIGENSCHAFTEN

VON ZELLEN IN VITRO

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

JOHANNA HEINLE

aus

AUGSBURG

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. P. Dörmer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 1986

- 1 EINLEITUNG
 - 1.1 Tumorwachstum und Tumorthherapie
 - 1.1.1 Pathophysiologie der Tumoren
 - 1.1.2 Zellkinetische Grundlagen zytostatischer Therapie
 - 1.2 Cisplatin
 - 1.2.1 Geschichte des Cisplatin
 - 1.2.2 Chemische Eigenschaften des Cisplatin
 - 1.3 Überblick über bisher bekannte Wirkungen von Cisplatin auf zellulärer Ebene
 - 1.3.1 Hemmung des Zellwachstums durch Cisplatin
 - 1.3.2 Hemmung der DNS-Synthese durch Cisplatin
 - 1.3.3 Flußzytometrische Untersuchungen zur veränderten Zellkinetik unter Cisplatin
 - 1.3.4 Selektive Wirkung von Cisplatin auf Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen
 - 1.4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit
- 2 MATERIAL UND METHODEN
 - 2.1 Handhabung der verschiedenen Zelllinien
 - 2.1.1 Kultivierung von L-Zellen
 - 2.1.2 Kultivierung von REH-Zellen
 - 2.2 Messung der Zellproliferation
 - 2.2.1 Wachstumskurven
 - 2.2.1 Verdünnungswachstumskurven
 - 2.3 Behandlung der Zellen mit Cisplatin
 - 2.3.1 Applikation von Cisplatin
 - 2.3.2 Zeitlich begrenzte Behandlung mit Cisplatin
 - 2.3.3 Langzeitbehandlung der Zellen mit Cisplatin

2.4 Flußzytometrische Untersuchungen (FCM)

2.4.1 Messung der Fluoreszenz

2.4.2 Entstehung von DNS-Histogrammen

2.4.3 Anfärbung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff

2.4.4 Quantitative Auswertung von DNS-Histogrammen

2.4.5 Einfache dynamische FCM-Untersuchungen

2.4.6 Colcemid-Methode

2.4.7 BrdU-Methode

3 ERGEBNISSE

3.1 Wachstumshemmende Wirkung des Cisplatin

3.1.1 Abhängigkeit der Wachstumsinhibition von der Cisplatin-Konzentration

3.1.2 Kinetik der Cisplatin-induzierten Wachstumshemmung

3.1.3 Langzeitwirkung von Cisplatin auf das Wachstumsverhalten

3.2 Wirkung von Cisplatin auf die Progression der Zellen im Zellzyklus

3.2.1 Änderungen der Kompartimentverteilung innerhalb des ersten Zellzyklus nach Gabe von Cisplatin

3.2.2 Zusammenhang zwischen der Hemmung im Zellzyklus und der Wachstumshemmung nach Gabe von Cisplatin

3.2.3 Veränderungen der DNS-Histogramme unter langfristiger Behandlung mit Cisplatin

3.3 Erholungsfähigkeit von Zellen nach zeitlich begrenzter Behandlung mit Cisplatin

3.3.1 Erholungsfähigkeit behandelter L-Zellen

3.3.2 Erholungsfähigkeit von REH-Zellen

3.4 Wirkung von Cisplatin auf den Übergang von ruhenden Zellen ins proliferative Stadium

3.4.1 Abhängigkeit des Teilungsverhaltens von der Cisplatin-konzentration

- 3.4.2 Abhängigkeit der Hemmung der Teilungskinetik von der Behandlungsdauer
- 3.4.3 Abhängigkeit der Teilungshemmung von der Cisplatin-Konzentration bei Behandlung der Zellen vor Stimulierung
- 3.4.4 Abhängigkeit der Teilungshemmung von der Behandlungsdauer bei Behandlung der Zellen vor Stimulierung

4 DISKUSSION

- 4.1 Diskussion der Methoden: Wachstumskurven im Vergleich zu Koloniebildungstests
- 4.2 Wachstumshemmende Wirkung des Cisplatin
 - 4.2.1 Interpretation der ermittelten Dosis-Wirkungsbeziehungen
 - 4.2.2 Kinetik der Wachstumshemmung
 - 4.2.3 Langzeitwirkung von Cisplatin in der Zellkultur
- 4.3 Cisplatin-induzierte Veränderungen der Verteilung der Zellen im Zellzyklus
 - 4.3.1 Veränderungen innerhalb des ersten Zellzyklus
 - 4.3.2 Veränderungen unter mehrwöchiger Cisplatin-Behandlung
- 4.4 Erholungsfähigkeit Cisplatin-geschädigter Zellen
- 4.5 Wirkung der Cisplatin auf die Kinetik des Übergangs ruhender Zellen ins proliferative Stadium

5 ZUSAMMENFASSUNG

6 LITERATURVERZEICHNIS

IN DIESER ARBEIT BENUTZTE ABKÜRZUNGEN :

BrdU: Bromdesoxyuridin

EB : Äthidium-Bromid

FCM : Flußzytometrie

FCS : Fötales Kälberserum

H-33258 : Höchst Farbstoff 33258

PBS : Phosphate Buffered Saline

PI : Propidium-Jodid

1 EINLEITUNG

1.1 Tumorwachstum und Tumorthherapie

1.1.1 Pathophysiologie der Tumoren

Tumorzellproliferation erfolgt wie normale Proliferation durch mitotische Teilung einer Zelle in zwei Tochterzellen. Dieser Ablauf wird normalerweise durch direkten Zellkontakt oder durch humorale Faktoren geregelt. Bei Entgleisung dieser Steuerung kann es zu einer Störung des lokalen Fließgleichgewichts zwischen Zellneubildung und Zelluntergang zugunsten der Zellneubildung kommen. Das daraus resultierende Tumorstadium kann den Organismus durch verdrängendes, infiltrierendes oder metastasierendes Wachstum zerstören.

Das neoplastische Wachstumsverhalten eines Tumors wird im wesentlichen durch folgende zellkinetische Merkmale bestimmt:

- Dauer des Teilungszyklus: entgegen früheren Vorstellungen dauert der Zellzyklus in den neoplastischen Geweben durchschnittlich länger als in den homologen Normalgeweben.
- Größe des am Wachstum teilnehmenden Populationsanteils: dieser macht insbesondere in langsam wachsenden Tumoren und in hypoxischen Tumorgebieten nur einen Bruchteil der Tumorphasepopulation aus. Unter den nicht am Wachstum teilnehmenden Tumorzellen können sich ruhende Zellen in einem sogenannten G₀-Stadium befinden, aus dem sie unter Umständen wieder in den proliferativen Pool zurückkehren können (Recruitment).
- Umfang des Zellverlusts: die Gefäßversorgung ist der wahrscheinlich ausschlaggebende Faktor für den Verlust von Tumorzellen durch Nekrose und Exfoliation. Das Ausmaß des Zellverlusts wiederum ist hauptsächlich verantwortlich für die Größenzunahme eines Tumors (22, 99, 101).

1.1.2 Zellkinetische Grundlagen zytostatischer Therapie

Ziel der Behandlung eines diagnostizierten Tumors ist die möglichst selektive Entfernung aller Tumorzellen aus dem Organismus. Bei lokalen Tumoren genügen oft chirurgische Entfernung und Bestrahlung. Generalisierte Tumore und nach lokaler Behandlung verbliebene Tumorreste indizieren die systemische Tumorthherapie mit Zytostatika (36).

Zytostatika sind Pharmaka, die aufgrund ihrer wachstumshemmenden und zellzerstörenden Eigenschaften in der Tumorthherapie eingesetzt werden. Die zytostatische Wirksamkeit einer Substanz wird durch den Grad der Selektivität im Einfluß auf die zellkinetischen Merkmale des zu behandelnden Tumors bestimmt:

- Verhinderung oder Verlangsamung neuer Zellteilungen
- Hemmung des Übergangs der Tumorzellen vom nicht proliferativen in den proliferativen Populationsanteil
- Verstärkung des Zelluntergangs

Ausschlaggebend für den Erfolg einer Therapie ist dabei das Ausmaß und die Irreversibilität der induzierten Veränderungen .

Die meisten in der Tumorthherapie eingesetzten Substanzen greifen spezifisch in bestimmte Vorgänge während des Zellzyklus ein, z. B. DNS-Synthese, Transkription, Ausbildung der Mitosespindel (36). Diese phasenspezifische Wirkung äußert sich in einer Veränderung der entsprechenden zellkinetischen Parameter. Auf der Kenntnis dieser Ereignisse basiert historisch die Entwicklung besonderer Therapieformen (Polychemotherapie, fraktionierte Chemotherapie), bei denen versucht wird, mit möglichst geringgehaltenen Dosen ein Optimum an zytostatischer Wirkung bei möglichst wenigen unerwünschten Wirkungen zu erreichen (17, 36).

1.2 Cisplatin

1.2.1 Geschichte des Cisplatin

Cisplatin wurde bereits 1845 von Peyrone synthetisiert. Erst 1965 jedoch entdeckte Rosenberg die Biologische Aktivität verschiedener Platin-Salze, als er die Auswirkungen elektrischer Felder zwischen zwei Platinelektroden auf das Wachstum von *Escherichia Coli* untersuchte (41, 88, 92). Bei der dann folgenden systematischen Untersuchung von Elektrolyseprodukten von Platinelektroden erwies sich Cisplatin hinsichtlich seiner antibiotischen Eigenschaften als die wirksamste Substanz.

1967 konnten Rosenberg et al. die Tumorstärke des Cisplatin gegen das solide Sarkom 180 und die L 1210 Leukämie bei Mäusen aufzeigen (89, 90). Die Tumorstärke ließ sich im folgenden an einer Reihe anderer tierischer Tumore nachweisen (21, 41, 51, 59, 81, 87, 91, 93, 98, 112).

1971 begann die klinische Erprobung des Cisplatin. Trotz seiner erheblichen unerwünschten Wirkungen, von denen neben den gastrointestinalen Erscheinungen, ototoxischen und neurotoxischen Wirkungen insbesondere die hohe Nephrotoxizität zu nennen ist (15, 23, 41, 45, 50, 73, 77, 93), wird Cisplatin bei einer Reihe unterschiedlicher menschlicher Tumoren mit Erfolg eingesetzt (20, 49, 77, 93).

1.2.2 Chemische Eigenschaften des Cisplatin

Cisplatin (cis-Diamindichlorplatin II) ist eine plane Platinverbindung. Das zentrale Platinatom ist von vier in einer Ebene liegenden Liganden umgeben.

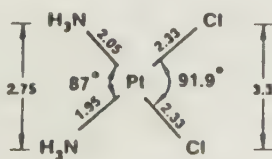


Abb. 1: Cisplatin

Cisplatin ist bis zu einer Konzentration von 1 g/l wasserlöslich. Im Extrazellulärraum (Cl^- -Konzentration ca. 100 mM) liegt es in neutraler Form vor und kann die Zellmembran leicht durchdringen. Im Intrazellulärraum mit einer Chlorid-Konzentration von etwa 4 mM sind die Bedingungen für die nukleophile Substitution der Chlorid-Liganden gegeben. Bei den dort gebildeten Folgeprodukten handelt es sich um ausgesprochen reagible Substanzen (52, 66, 69, 92, 106, 117). Diese können Reaktionen mit den zellulären Makromolekülen eingehen.

Neben der Derepression viruskodierter Information, was zu einer gesteigerten Antigenität der Zelle führen soll (91), sowie der Stimulierung körpereigener Abwehrzellen (57, 58) wird vor allem eine direkte Schädigung der DNS durch Cisplatin diskutiert. Prinzipiell werden zwei Reaktionsmechanismen in Betracht gezogen, über die Cisplatin mit den nukleophilen Bindungsstellen der DNS reagieren kann:

- Bildung von Chelatkomplexen mit Fehlpaarungen in der folgenden Replikationsrunde (92, 117)
- Bildung von DNS-Proteinvernetzungen, DNS-Einzelstrangvernetzungen und DNS-Doppelstrangvernetzungen (24, 52, 80, 82, 117).

An verschiedenen tierischen (115, 116, 117, 118) und menschlichen (32, 34, 65, 78) Zelllinien konnte gezeigt werden, daß die DNS-Vernetzungen die für die zytostatische Wirksamkeit des Cisplatin verantwortliche Läsion sind. Hierbei scheinen die Doppelstrangvernetzungen, deren Bildung erst einige Stunden nach beendeter Inkubation ein Maximum erreicht (32, 34, 79, 80, 84, 114, 116, 117), die entscheidende Rolle zu spielen.

1.3 Überblick über bisher bekannte Wirkungen von Cisplatin auf zellulärer Ebene

1.3.1 Hemmung des Zellwachstums durch Cisplatin

Während zum Wachstumsverhalten von Zellen unter Cisplatin-Behandlung detaillierte, mit Hilfe von Wachstumskurven durchgeführte Untersuchungen nicht zu finden sind, wurde die wachstumshemmende Wirkung des Cisplatin durch einfache Bestimmung der Zellzahlen in behandelten sowie in unbehandelten Populationen von L 1210 Leukämiezellen aufgezeigt (16, 33, 108). An verschiedenen Zelllinien konnte nach einmaliger Bestimmung der Zellzahlen in den behandelten Zellpopulationen dargestellt werden, daß das Ausmaß der Cisplatin-induzierten Wachstumsinhibition jenseits einer Schwellenkonzentration von der Höhe der applizierten Cisplatin-Dosis abhängt. Bei höheren Cisplatin-Dosen wird schließlich ein Plateau der Wirkung erreicht (34, 65, 118).

Ähnliche Ergebnisse konnten mit Hilfe von Koloniebildungstests erbracht werden. Eine maximale Wachstumshemmung bei hohen Cisplatin-Dosen ließ sich jedoch innerhalb der untersuchten Konzentrationsbereiche nicht beobachten (4, 5, 7, 19, 25, 26, 27, 29, 32, 34, 39, 53, 74, 75, 76, 78, 80, 82, 83, 85, 95, 105, 107, 114, 116, 118). Neben der Abhängigkeit der Wachstumsinhibition von der Cisplatin-Konzentration konnten einige dieser Arbeitsgruppen an verschiedenen Zelllinien zeigen, daß das Proliferationsvermögen der behandelten Zellen mit zunehmender Inkubationszeit abnimmt, so daß die wachstumshemmende Wirkung des Cisplatin als eine Funktion des Produkts von Dosis und Zeit angesehen werden kann (5, 25, 26, 74, 85).

Hinsichtlich der Reversibilität der durch Cisplatin hervorgerufenen Wachstumshemmung liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Während an verschiedenen Zelllinien beobachtet wurde, daß asynchron wachsende Zellen nicht imstande waren,

sich von einer subletalen Schädigung durch Cisplatin zu erholen (5, 26), wird in einer Arbeit von Zwelling et al. (118) gezeigt, daß Cisplatin-behandelte murine Leukämie-Zellen eine erneute Wachstumstendenz aufwiesen. Ebenso wurde an Chinesischen Hamster-Zellen beschrieben, daß das proliferative Potential stationärer Zellen mit zunehmender Zeit nach Cisplatin-Behandlung wächst (38). Ähnliche Beobachtungen liegen auch von einem in vivo Tumormodell eines humanen Plattenepithelkarzinoms vor (110).

1.3.2 Hemmung der DNS-Synthese durch Cisplatin

Erste Untersuchungen zur Beeinflussung der DNS-Syntheserate durch Cisplatin wurden von Harder und Rosenberg an menschlichen AV₃-Amnionzellen durchgeführt (46). Bei geringen Cisplatin-Konzentrationen beobachteten sie eine selektive, bei höheren Konzentrationen eine im Vergleich zu RNS- und Protein-Synthese bevorzugte DNS-Synthesehemmung. Bei allen Cisplatin-Konzentrationen trat diese erst einige Stunden nach der Behandlung der Zellen auf und blieb dann selbst nach Entfernung des Cisplatin aus dem System irreversibel. Das Ausmaß der DNS-Synthesehemmung war abhängig von der Cisplatin-Konzentration. Diese Ergebnisse ließen sich an verschiedenen Zelllinien bestätigen (54, 55, 83). Dagegen konnte an einigen anderen Zelllinien weder die Selektivität (35, 108) noch die Persistenz (38, 94, 110) der DNS-Synthesehemmung beobachtet werden.

Trotz dieser Widersprüche hinsichtlich Selektivität und Persistenz der DNS-Synthesehemmung kann als gesichert gelten, daß Cisplatin eine Schädigung zellulärer Strukturen bewirkt, die einen Abfall der DNS-Syntheserate zur Folge hat. Die Bestimmung der DNS-Syntheserate in einer Zellpopulation gestattet jedoch nur Aussagen über die globale Syntheseleistung dieser Zellpopulation. Aus einem Abfall der DNS-Syntheserate geht nicht hervor, ob die Einzelzelle nur noch weniger

Syntheseleistung erbringen kann, oder ob der Anteil DNS-synthetisierender Zellen geringer geworden ist. Diese Informationen müssen mit Hilfe geeigneter Methoden (Autoradiographie, Flußzytometrie) gewonnen werden.

1.3.3 Flußzytometrische Untersuchungen zur veränderten Zellkinetik unter Cisplatin

Prinzip der Flußzytometrie (71) wie auch der Autoradiographie (99) ist die Betrachtung der einzelnen Zelle aus einer Zellpopulation. In einer Einzelzellsuspension werden bei der Flußzytometrie die zu bestimmenden Zellinhaltsstoffe (z. B. DNS) selektiv angefärbt. In einem Durchflußverfahren werden die Zellen zur Fluoreszenz angeregt, und die Fluoreszenzmenge pro Zelle gemessen. Aus der Häufigkeitsverteilung von Zellen bestimmten DNS-Gehaltes in der Zellpopulation (DNS-Histogramme) läßt sich der prozentuale Anteil von Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen ansehen.

Da es sich bei der Flußzytometrie um eine relativ junge Methode handelt (42), gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit Hilfe dieser Methode mit der Cisplatin-Wirkung beschäftigt haben. Die erste derartige Studie wurde an Zellen einer menschlichen Kolonkarzinomzelllinie *in vitro* durchgeführt (6). Mit Hilfe flußzytometrischer sowie autoradiographischer Methoden wurden komplexe, mit einigen Stunden Verzögerung auftretende Veränderungen der Kompartimentsverteilung der Zellen aufgedeckt: Mit steigender Cisplatin-Konzentration und zunehmender Behandlungsdauer verzögert Cisplatin die Progression der Zellen im Zellzyklus in der S-Phase, in der (G_2+M)-Phase und schließlich auch in der G_1 -Phase. Es wurde gezeigt, daß die Cisplatin-induzierten Anhäufungen von Zellen in den einzelnen Zellkompartimenten bestehen bleiben, wobei das Auftreten einer Fraktion hypertetraploider Zellen beschrieben wurde. Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Wirkung von Cisplatin auf die Progression der Zellen im

Zellzyklus und der auf das Wachstum der behandelten Zellen konnten nicht gefunden werden.

Während 1981 bei Ehrlich Aszites Tumorzellen in vivo das Fehlen zellkinetischer Veränderungen nach Cisplatin-Behandlung beschrieben wurde (60), konnten bei dieser Zelllinie 1983 hinsichtlich der Lokalisation der Cisplatin-induzierten Blockierungen der Zellen im Zellzyklus ähnliche Veränderungen beobachtet werden, wie sie bereits von Bergerat et al. (6) beschrieben waren (61). Im folgenden konnten an unterschiedlichen Zelllinien in vitro (95, 113) und in vivo (110, 113) Anhäufungen der Cisplatin-behandelten Zellen in der S-Phase und in der (G_2 +M)-Phase aufgezeigt werden. Es wurde sogar das Auftreten einer Synchronwelle nach der Anhäufung der behandelten Zellen in der S-Phase beschrieben, wobei der Synchronisationseffekt des Cisplatin in vitro auf Konzentrationen von ca. 1 mg/l beschränkt zu sein scheint (113, 61).

1.3.4 Selektive Wirkung von Cisplatin auf Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen

Im allgemeinen wird Cisplatin als ein nicht phasenspezifisches Zytostatikum angesehen (18, 37). Jedoch sprechen Ergebnisse einer Reihe von nicht-flußzytometrischen Studien an verschiedenen Zelllinien für eine bevorzugte oder spezifische Wirksamkeit des Cisplatin gegen G_1 -Zellen (25, 26, 39, 43, 44, 72, 96, 97, 103). Es konnte nachgewiesen werden, daß die vermehrte Empfindlichkeit von G_1 -Zellen nicht durch eine vermehrte Aufnahme von Cisplatin in die Zelle bedingt ist (38). Jedoch scheint dieser phasenspezifische Effekt erst bei hohen Cisplatin-Konzentrationen ausgeprägt vorhanden zu sein und bei therapeutisch erreichbaren Konzentrationen (2 mg/kg Körpergewicht (23)) nur untergeordnete Bedeutung zu besitzen (25, 26).

Es wird allgemein die Ansicht vertreten, daß ruhende Zellen gegen eine zytostatische Behandlung unempfindlich seien (36).

Im Widerspruch dazu wurde im Zusammenhang mit Untersuchungen zum Einfluß von Hyperthermie auf die proliferationshemmende Wirkung des Cisplatin beschrieben, daß Zellen einer menschlichen Kolonkarzinomzelllinie, die während der stationären Phase behandelt wurden, qualitativ und quantitativ ähnliche Einschränkung des Proliferationsvermögens erfuhren wie Zellen, die in der exponentiellen Phase behandelt wurden (2). Im folgenden konnte dann sogar gezeigt werden, daß stationäre Zellen dieser Zelllinie größere Empfindlichkeit gegen Cisplatin besitzen als exponentiell wachsende (5, 30, 31). Auch bei der Behandlung stationärer Chinesischer Hamster-Zellen ließ sich eine Einschränkung des Proliferationsvermögens der Zellen durch Cisplatin aufzeigen (38).

1.4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Kenntnis Cisplatin-induzierter Veränderungen der Zellkinetik verschiedener Zellen im Hinblick auf die therapeutische Wirksamkeit zu vertiefen:

Es wurde versucht, Ausmaß und Kinetik einer durch Cisplatin bewirkten Hemmung der Zellproliferation zu charakterisieren. Während sich bisherige Untersuchungen größtenteils mit den Auswirkungen kurzdauernder Cisplatin-Behandlungen beschäftigen, wurde besonderer Wert auf lange Behandlungen - und Beobachtungszeiten gelegt. Dieses Vorgehen erschien sinnvoll, da Cisplatin in vivo nur sehr langsam aus einigen Geweben ausgeschieden werden kann (67, 68), und da von Niell et al. gezeigt wurde, daß die Wirkung von Cisplatin in vitro nur bei langer Applikationsdauer den in vivo beobachteten Effekten entspricht (74).

Mit Hilfe flußzytometrischer Methoden wurde versucht, Informationen über die Wirkung von Cisplatin auf die Progression der Zellen im Zellzyklus zu erhalten. Eventuell vorhandene Zusammenhänge zwischen Ausmaß und Kinetik der Cisplatin-induzierten Hemmung im Zellzyklus und der durch

Cisplatin hervorgerufenen Wachstumsinhibition sollten aufgedeckt und dargestellt werden, was bisher noch nicht gelungen war (6).

Die Anwendung einer neuartigen flußzytometrischen Methode (BrdU-Methode s. 2.4.6') bot die Möglichkeit, die Teilungskinetik von Zellen präzise zu bestimmen. Es sollte der Versuch unternommen werden, die Wirkung von Cisplatin auf den Übergang vom nicht-proliferativen ins proliferative Stadium direkt darzustellen.

Da keine eindeutigen Ergebnisse zur Reversibilität der Cisplatin-induzierten Wachstumsinhibition vorliegen (5, 26, 38, 118), wurde im Hinblick auf die klinisch notwendigen therapiefreien Intervalle versucht, zu klären, ob und inwieweit sich Zellen von einer zeitlich befristeten Cisplatin-Behandlung wieder erholen können. Besonderer Wert wurde wiederum auf lange Beobachtungszeiten gelegt, um den in-vivo-Verhältnissen möglichst gut zu entsprechen, und um zu gewährleisten, daß alle Zellen genügend Zeit zur Erholung hatten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Handhabung der verschiedenen Zelllinien

2.1.1 Kultivierung von L-Zellen

a) Wachstumsbedingungen

Die verwendeten Mäusefibroblasten der Linie L 929 (L-Zellen) wuchsen als einzellige, adhärenente Schicht (Monolayer) auf einer Plastikoberfläche in Zellkulturflaschen (Nunc Nr. 153 732) bei 37° C und 5 % CO₂ in RMPI-1640-Medium (Seromed Nr. F 1215) mit 5 % fötalem Kälberserum (Gibco-Europe Nr. 692) und 2 mMol/l L-Glutamin (Seromes Nr. K 0282). Die Mediummenge betrug 0,4 ml pro cm² Bodenfläche. Zur Infektionsprophylaxe waren 50 000 IE/l Penicillin und 50 mg/l Streptomycin zugesetzt (Penicillin-Streptomycin Nr. A 2212 Seromed).

b) Zellernte

Nach fünfminütiger Behandlung der Zellen mit 0,25 % Trypsin (Gibco-Europe Nr. 343-5050) bei Raumtemperatur lockerten die Zellen ihren Kontakt zum Boden und konnten nach Inaktivierung des Trypsins durch Medium leicht abgespritzt werden, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, selektiven Zellverlust zu vermeiden.

c) Zellfixierung

Für spätere flußzytometrische Untersuchungen wurden die Zellproben fixiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurden diese in einem Teil 25 % Äthanol (Äthanol in 0,9 % NaCl-Lösung) aufgeschwemmt und 1 h bei Raumtemperatur belassen. Nach Zugabe von 4 Teilen 80 % Äthanol (Äthanol in 0,9 % NaCl-Lösung) wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 4° C aufbewahrt.

d) Weiterkultivierung

Nach einminütiger Inkubation der Zellen mit 0,25 % Trypsin

wurde das Trypsin abgegossen und die Zellen weitere 4 min mit dem restlichen Trypsin belassen. Mit neuem Medium wurden die Zellen vom Boden gelöst und zu einer Dichte von $1 - 2 \times 10^4/\text{cm}^2$ neu ausgesät.

e) Gewinnung exponentiell wachsender Zellen

Als exponentiell wachsende Zellen dienten solche, die nach der Subkultivierung für die Dauer von zwei Populationsverdopplungszeiten gewachsen waren und noch keine konfluierende Zellschicht gebildet hatten. Sie besaßen eine Populationsverdopplungszeit von 20 ± 2 h. Um möglichst konstante Versuchsbedingungen zu gewährleisten wurden zur Subkultivierung ebenfalls exponentiell wachsende Zellen verwendet.

f) Gewinnung stationärer Zellen

Nach der üblichen Aussaat hatten die Zellen am 4. bis 5. Tag ihr Wachstumsplateau bei einer Zelldichte von $4 - 5 \times 10^5/\text{cm}^2$ erreicht. Bei weiterhin regelmäßig stattfindendem Mediumwechsel wurden die Zellen ab dem 6. Tag in Medium mit reduzierter Serumkonzentration (0,5 % FCS) belassen.

g) Stimulierung ruhender Zellen

Die Wachstumsstimulierung erfolgte am 14. Tag nach Subkultivierung durch Aussaat der Zellen zu einer Dichte von $1 - 2 \times 10^4/\text{cm}^2$ Bodenfläche in Medium mit normaler Serumkonzentration (5 % FCS).

2.1.2 Kultivierung von REH-Zellen

a) Wachstumsbedingungen

Zellen einer menschlichen Leukämie-Zelllinie (REH-Zellen) wuchsen als Suspensionskultur in senkrecht gestellten Zellkulturflaschen (Nunc Nr. 153 732) unter denselben Kulturbedingungen wie L-Zellen. Bei optimaler Zelldichte besaßen die Zellen eine Populationsverdopplungszeit von 32 ± 2 h.

b) Zellernte

Nach homogener Verteilung der Zellen in der Suspension konnten gewünschte Zellproben unter sterilen Bedingungen leicht entnommen werden.

c) Fixierung der Zellen

Die Fixierung der REH-Zellen für spätere flußzytometrische Untersuchungen erfolgte wie bei L-Zellen.

d) Weiterkultivierung

Gewünschte Zelldichten wurden durch entsprechende Verdünnung der Zellsuspension mit angewärmtem Medium erreicht. Größere Verdünnungsschritte über das Verhältnis 1 : 1 hinaus wurden vermieden, da die Zellen, selbst wenn die Zellzahlen nach der Verdünnung noch immer im Wachstumsoptimum lagen, vorübergehend ein vermindertes Wachstum zeigten. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß nach einem zu großen Verdünnungsschritt mit unkonditioniertem Medium die Konzentration der von den Zellen selbst gebildeten wachstumsstimulierenden Faktoren stark absinkt und von den zurückgebliebenen Zellen nur langsam wieder aufgebaut werden kann. Bei Beginn der Experimente hatten die Zellen immer eine Dichte von $4 - 6 \times 10^5/\text{ml}$. Eine entsprechende Verdünnung der Zellsuspension erfolgte jeweils mindestens 8 h vor Beginn des Experiments.

2.2 Messung der Zellproliferation

2.2.1 Wachstumskurven

a) Theoretischer Hintergrund

Die Bestimmung der Zelldichte in Abhängigkeit von der Zeit (Wachstumskurve) ist die einfachste Messung zur Beurteilung der Zellproliferation. Teilt sich eine Zelle im System immer wieder nach konstanter Zeit in zwei Tochterzellen, so nimmt die Zellzahl im System exponentiell zu. Wird das Zellwachs-

tum durch irgendwelche Faktoren (zellulärer oder humoraler Art) begrenzt, so erreicht die Wachstumskurve bei einer bestimmten Zelldichte ein Plateau. Veränderungen des Proliferationsverhaltens nach Behandlung der Zellen mit einem Zytostatikum müssen sich durch Veränderungen der Wachstumskurve in bezug auf ihre Steigung und / oder auf die Höhe des Plateaus äußern. Ein Vergleich der Wachstumskurven geschädigter und nicht-geschädigter Zellpopulationen gestattet qualitative und auch quantitative Aussagen über die bewirkte Wachstumshemmung.

b) Erstellung der Wachstumskurven

Unmittelbar nach der Zellernte erfolgte nach geeigneter Verdünnung der Zellproben von L- und REH- Zellen die Bestimmung der Zelldichte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer oder eines Sysmex Microcellcounter (Coulter-Meßprinzip). Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden die bestimmten Zelldichten als Funktion der Zeit aufgezeichnet. Die in den Ergebnissen aufgeführten Zellzahlen entsprechen jeweils dem Mittelwert von drei unabhängigen Zählvorgängen.

Da bei der Verwendung des Microcellcounters sowohl größere Mengen von Zelltrümmern als auch von Zellverklumpungen die Ergebnisse verfälschen können, wurden die Ergebnisse gegebenenfalls durch Bestimmung der Zelldichten nach Zugabe von Centrimid überprüft (100). Centrimid ist ein Detergens, das die aus Lipoproteinen bestehende Zellmembran wie auch Zelltrümmer und Zellverklumpungen in kurzer Zeit vollkommen auflösen kann. Die Probe enthält dann nur noch nackte Zellkerne aus vormals intakten Zellen. Ihre Zahl kann dann nach entsprechender Verstärkung der Signale im Microcellcounter leicht und zuverlässig bestimmt werden.

2.2.2 Verdünnungswachstumskurven

Verdünnungswachstumskurven wurden an REH-Zellen zur Beobachtung der Langzeitwirkung von Cisplatin sowie der Erholungsfähigkeit der Zellen nach Cisplatin-Behandlung eingesetzt.

Grundlage für die Erstellung von Verdünnungswachstumskurven ist, daß auch Tumorzellen ein Wachstumsoptimum bei einer gewissen Zelldichte besitzen (5×10^5 bis 1×10^6 pro ml bei REH-Zellen), oberhalb derer die Zellen durch Verarmung des Mediums an Nährstoffen in ihrer Proliferation eingeschränkt werden. Wird dieser Nährstoffmangel verhindert, können die Zellen über sehr lange Zeit unter optimalen Wachstumsbedingungen beobachtet werden (14).

Entsprechend den Populationsverdopplungszeiten der REH-Zellen wurden die Zellsuspensionen nach homogener Verteilung der Zellen mit neuem, warmem Medium im Verhältnis 1 : 1 verdünnt. Größere Verdünnungsschritte wurden aus oben genannten Gründen vermieden (s. 2.1.2). Bei der Arbeit mit Cisplatin-Konzentrationen, die die Zellzahlen stagnieren ließen, wurde ohne Veränderung der Zelldichte in dreitägigem Rhythmus jeweils ein Teil des alten Mediums gegen neues ausgetauscht, um eine Verarmung des Mediums an Nährstoffen zu vermeiden.

Unter Berücksichtigung der einzelnen Verdünnungsschritte wurden die Wachstumskurven erstellt, die das Wachstumverhalten der Zellen über längere Zeit unter optimalen Versuchsbedingungen repräsentieren (Verdünnungswachstumskurven). Die bis zu einem Zeitpunkt t im System ohne Verdünnungsschritte theoretisch erreichte Zelldichte errechnet sich bei konstantem Verdünnungsfaktor von 2 aus der wirklichen Zelldichte zum Zeitpunkt t und der Anzahl der Verdünnungsschritte:

$$N_{\text{theor.}} = N_t \times 2^n$$

$N_{\text{theor.}}$	=	theoretisch erreichte Zelldichte
N_t	=	Zelldichte zum Zeitpunkt t
n	=	Anzahl der Verdünnungsschritte bis zum Zeitpunkt t

2.3 Behandlung der Zellen mit Cisplatin

2.3.1 Applikation von Cisplatin

Cisplatin wurde in der therapeutischen Darreichungsform 10 mg Cisplatin und 100 mg Mannit in 200 mg Trockenmasse (Platinex, Bristol Arzneimittel, Bergisch Gladbach) verwendet. Es wurde mit 10 ml Aqua dest. zu Injektion (Fresenius) aufgelöst, so daß eine Stammlösung mit der Konzentration 1 g/l entstand, die dann entsprechend weiterverdünnt wurde. Die Lösungen wurden immer möglichst frisch zubereitet.

Cisplatin-Behandlung der Zellen erfolgte durch einfache Zugabe relativ kleiner Mengen von Cisplatin-Lösung geeigneter Konzentration zum Nährmedium. Die Höchstmenge zugegebener Cisplatin-Lösung betrug 0,1 ml auf 10 ml Medium, um eine Verdünnung des Nährmediums zu vermeiden. Dem Mannit kommt bei der starken Verdünnung der Cisplatin-Lösung keine osmotische Wirkung mehr zu. Eine Inaktivierung des Cisplatin durch Serumproteine des FCS, wie sie im menschlichen Körper nach fast vollständiger Bindung des Cisplatin an Serumproteine beschrieben wurde (3, 62, 69, 73, 104), konnte in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Bergerat et al. (5, 6) durch Vorexperimente ausgeschlossen werden.

2.3.2 Zeitlich begrenzte Behandlung mit Cisplatin

Zur Untersuchung der Erholungsfähigkeit von Zellen von einem durch Cisplatin gesetzten Schaden wurden die Zellen zeitlich begrenzten Cisplatin-Behandlungen ausgesetzt. In L-Zell-Kulturen wurde nach Ablauf der Behandlungsdauer das Cisplatin-haltige Medium sorgfältig entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37° C erfolgte ein zweiter Mediumwechsel, um Cisplatin-Rückstände möglichst vollständig zu entfernen. REH-Zellen wurden nach homogener Verteilung der Zellen in der Zellsuspension abzentrifugiert.

Nach sorgfältiger Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in neuem Medium aufgeschwemmt und 5 min bei 37° C inkubiert. Der Vorgang wurde dann noch einmal wiederholt.

Die Waschvorgänge erfolgten immer mit angewärmtem Medium, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß Waschvorgänge mit PBS zu massivem Zellverlust und einer meßbaren Wachstumsinhibition innerhalb der ersten 12 h nach der Waschprozedur führten (Abb. 2)

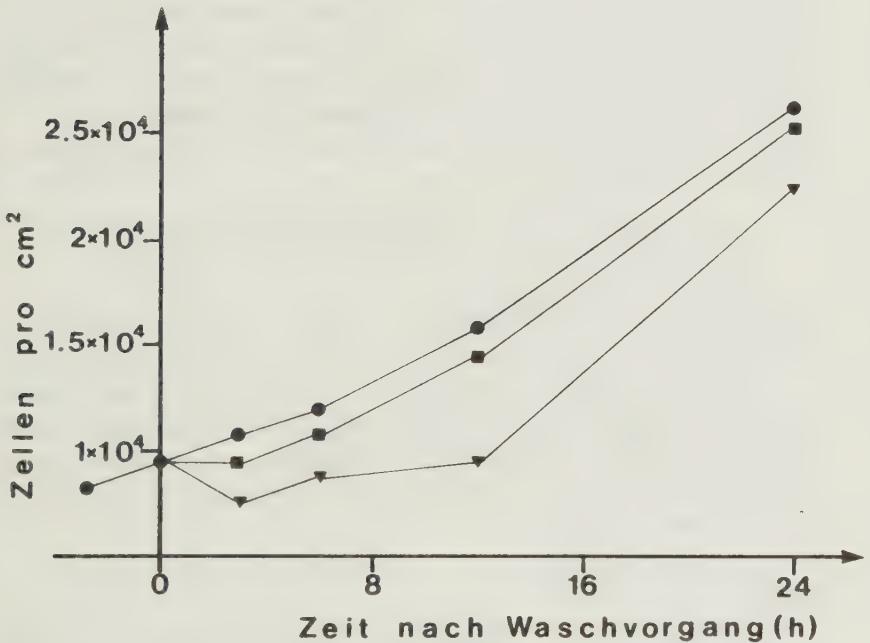


Abb. 2: Wachstumskurve von L-Zellen, Zellzahl/cm² als Funktion der Zeit nach dem Waschvorgang bei t = 0 h,
 ● = Kontrolle, ■ = mit Medium gewaschene Zellpopulationen, ▼ = mit PBS gewaschene Zellpopulationen

2.3.3 Langzeitbehandlung der Zellen mit Cisplatin

Durch Vorversuche konnte in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Bergerat et al. (5, 6) gesichert werden, daß die Konzentration wirksamen Cisplatin im Nährmedium konstant bleibt, daß die Zellen Cisplatin weder dem Nährmedium in nennenswertem Umfang entziehen, noch es in inaktive Metabolite umsetzen können (s.a. 66). Aus diesem Grund konnten die bei der Untersuchung der Langzeitbehandlung von L- und REH-Zellen zur Aufrechterhaltung des Nährstoffangebots notwendigen Mediumwechsel durch Austausch des alten Mediums gegen frisches Medium mit der anfänglichen Cisplatin-Konzentration erfolgen. Auch die für die Verdünnungswachstumskurven unter Cisplatin-Dauerbehandlung nötigen Verdünnungsschritte konnten mit neuem Medium erfolgen, dessen Cisplatin-Konzentration jeweils der des alten Mediums entsprach.

2.4 Flußzytometrische Untersuchungen

2.4.1 Messung der Fluoreszenz

Nach spezifischer Anfärbung der zellulären DNS wurde die Fluoreszenzausbeute der Zellproben teils mit einem ICP 11 (Impulszytrophotometer, Phywe, Göttingen), teils mit einem FACS II Cell Sorter (Becton Dickinson FACS Systems, Sunnyvale, CA) gemessen.

Flußzytometer bestehen im Prinzip aus drei Funktionseinheiten:

- Strömungssystem: In einer Einzelzellsuspension werden die angefärbten Zellen in der Farbstofflösung durch eine enge Öffnung bewegt, die jeweils immer nur einer Zelle den Durchtritt gestattet.
- Lichtsystem: Nach Auswahl des gewünschten Spektralbereichs wird in einer Ebene dieser Öffnung die einzelne Zelle zur Fluoreszenz angeregt. Die Fluoreszenzsignale werden auf

einen Photoelektronenvervielfacher weitergeleitet.

- Elektronik: Die Impulse aus dem Photoelektronenmultiplier werden von einem Analog-Digital-Converter digitalisiert und in einem Vielkanalsystem nach Impulshöhe geordnet.

2.4.2 Entstehung von DNS-Histogrammen

Voraussetzung für die Entstehung verwertbarer DNS-Histogramme ist, daß die gemessene Fluoreszenzmenge pro Zelle der DNS-Menge pro Zelle entspricht. Dies kann nur durch stöchiometrische und spezifische Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs an die DNS erreicht werden. Das Ausmaß der Anfärbung muß unabhängig vom Zustand der Zelle sein (Zellalter, Proliferationszustand) und darf auch durch ein zu untersuchendes Pharmakon nicht verändert werden.

DNS-Histogramme entstehen dadurch, daß nach Messung der Fluoreszenzmengen der einzelnen Zellen die relative Häufigkeit von Zellen mit einem bestimmten DNS-Gehalt gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen wird. Das entstandene Bild repräsentiert die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen, da diesen jeweils ein definierter DNS-Gehalt zugeordnet werden kann. Abb. 3 veranschaulicht das Zustandekommen eines DNS-Histogramms einer exponentiell wachsenden Zellpopulation (8).

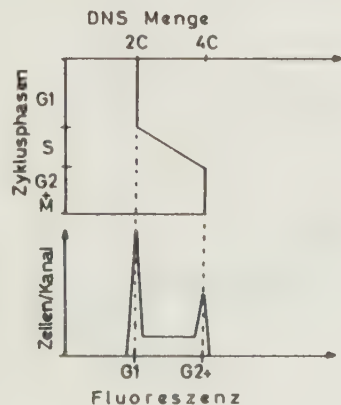


Abb. 3:

Entstehung eines DNS-Histogramms einer exponentiell wachsenden Zellpopulation

Als Kriterien zur Beurteilung der Histogrammualität gelten:

- Schmale und symmetrische Peaks bei 2C und 4C
- Doppelte Fluoreszenz bei 4C im Vergleich zu der bei 2C
- Nur ein 2C-Peak bei einer Mischung von ruhenden (o) und proliferierenden Zellen (p)(8).

Während Sumner (102) beschrieben hatte, daß durch Cisplatin (300 mg/l) die Anfärbbbarkeit isolierter Lymphozytenkerne mit basischen Farbstoffen, unter anderem mit H-33258 und Äthidium-Bromid, vermindert werde, konnte ein derartiger Cisplatin-Effekt bei der Aufnahme von DNS-Histogrammen von L- und REH-Zellen nicht beobachtet werden. Auch bei gemischten Zellproben, die unbehandelte und behandelte Zellen enthielten (maximal 20 mg/l Cisplatin), zeigten die DNS-Histogramme schmale, eingipflige Peaks.

2.4.3 Anfärbung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff

Nach homogener Verteilung der fixierten Zellen in der Zellprobe wurden die Zellen abzentrifugiert. Die Zellen wurden in der Farbstofflösung aufgeschwemmt und 1 h bei Raumtemperatur belassen. Nachdem dann die Färbekinetik abgelaufen war, konnte die Fluoreszenz gemessen werden. Die verwendeten Farbstoffe und Farbstoffkombinationen sind in Tab. 1 mit dem jeweiligen Hersteller angegeben.

Tab. 1: Farbstoffe mit jeweiligem Hersteller

Substanz	Hersteller
Höchst 33258 (4 mg/l)	Farbwerke Höchst AG Frankfurt
Propidium-Jodid (5 mg/l)	Serva Feinbiochemica Heidelberg
+ Höchst 33258 (2 mg/l)	Farbwerke Höchst AG Frankfurt
Äthidium-Bromid (5 - 7 mg/l)	Serva Feinbiochemica Heidelberg
+ Höchst 33258 (2 mg/l)	Farbwerke Höchst AG Frankfurt

Die Farbstoffe wurden jeweils in 25 % Äthanol in PBS gelöst. Durch den beigefügten Alkohol wird die Fluoreszenzausbeute gesteigert und die gefärbte Zellsuspension konserviert (13). Gefärbte Zellproben konnten länger als 4 Wochen bei 4° C aufbewahrt werden, ohne daß die DNS-Histogramme schlechtere Qualität zeigten.

2.4.4 Quantitative Auswertung von DNS-Histogrammen

Zur Bestimmung der Anteile von Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen wurden die relativen Größen des G_1 - und des (G_2+M)-Peaks sowie des dazwischenliegenden S-Phasen-Anteils durch Ausschneiden aus den Histogrammbildern und Wägen bestimmt. Da es sich bei dem Übergang der Zellen von G_1 nach S, sowie von S nach (G_2+M) um einen kontinuierlichen Prozeß handelt, ist eine diskrete Unterscheidung der einzelnen Kompartimente selbst mit höchster Auflösung und besten Auswertungsmöglichkeiten nicht möglich. Die Abgrenzung der einzelnen Kompartimente wurde, wie in Abb. 4 dargestellt, durch einfache Annäherung vorgenommen, da aufgrund vorausgegangener Untersuchungen angenommen werden konnte, daß die aus dieser Annäherung resultierenden Unsicherheiten und Fehlermöglichkeiten sich im Rahmen der Schwankungen biologischer Experimente bewegen.

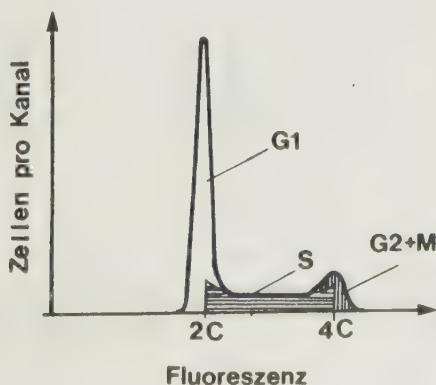


Abb.4:
Prinzip der Histogrammauswertung bei exponentiell wachsenden Zellpopulationen

Während qualitative Veränderungen der Kompartimentsverteilung durch Histogrammfolgen demonstriert wurden, wurde immer dann auf eine quantitative Analyse der Histogramme verzichtet, wenn aufgrund der Cisplatin-induzierten Verteilungsveränderungen eine annäherungsweise Abgrenzung der Kompartimentsinhalte nicht vertretbar war.

2.4.5 Einfache dynamische FCM-Untersuchungen

Während in einer asynchron wachsenden Zellpopulation die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen konstant bleibt, kann durch eine Serie von DNS-Histogrammen die Entstehung von Verteilungsveränderungen beobachtet werden, die sich als Folge zellkinetischer Effekte eines Zytostatikums ausbilden. Werden nach quantitativer Auswertung der DNS-Histogramme die Phasenanteile als Funktion der Zeit aufgetragen, läßt sich der Ablauf der Verteilungsveränderungen anschaulich demonstrieren.

Aus den DNS-Histogrammen ist jedoch nicht zu erkennen, ob und inwieweit Zellen, die nach der Schädigung noch eine oder sogar mehrere Zellteilungen vollenden konnten, zu der Entstehung der zu beobachtenden Häufigkeitsverteilungen beigetragen haben. Auch eine sofortige und vollständige Blockierung aller Zellen kann anhand einer Serie einfacher DNS-Histogramme nicht von einer fehlenden Beeinträchtigung der Zellen unterschieden werden, da sich in beiden Fällen die Fluoreszenzverteilung unverändert darstellt (13). Zur Lösung dieser Probleme wurde in der vorliegenden Arbeit die Colcemid-Methode angewendet.

2.4.6 Colcemid-Methode

Die Colcemid-Methode wurde von einer anderen Arbeitsgruppe (63) und von Böhmer (8, 10, 13) entwickelt. Sie basiert auf der Überlegung, daß der Zellzyklus in geeigneter Weise unter-

brochen werden muß, um dann durch DNS-Histogrammfolgen die Progression asynchroner Zellpopulationen beobachten zu können, welche sonst konstante Fluoreszenzverteilungsmuster aufweisen. Als blockierende Substanz wird Colcemid verwendet, das wie das analoge Colchicin die Vollendung der Mitose verhindert. Dies bewirkt, daß die Zellen sich im (G_2+M)-Kompartiment sammeln, während das G_1 - und auch das S-Kompartiment durch eine ungestörte Progression der Zellen im Zellzyklus bis zur Mitose leerlaufen. Die Zellen verbleiben im 4C-Kompartiment, bis sie schließlich zu höherer Ploidie weiterwachsen. Zur Veranschaulichung dieser Effekte zeigt Abb. 5 eine entsprechende Folge von DNS-Histogrammen exponentieller L-Zellen.

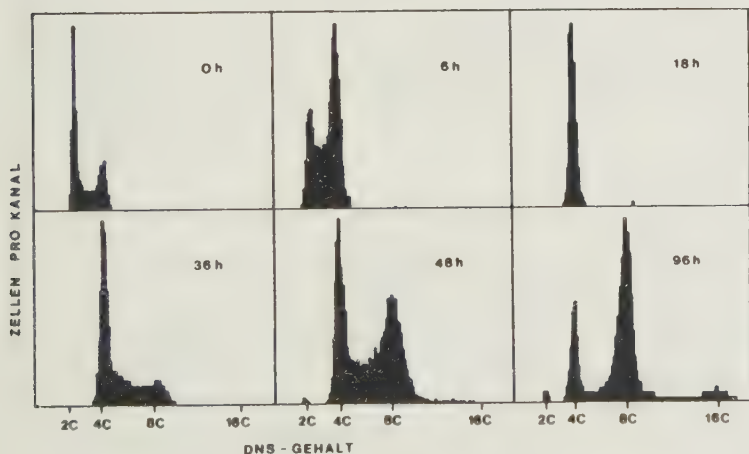


Abb. 5: DNS-Histogramme von L-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Colcemid-Gabe (0,1 mg/l)

Durch Bestimmung der G_1 - und S-Phasenanteile in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn der Colcemid-Inkubation (Auslaufkurven) können die absoluten Phasenzeiten sowie der relative Anteil nicht-proliferierender Zellen bestimmt werden. Die Colcemid-Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet, um mit ihr die Cisplatin-induzierte Hemmung der Progression der Zellen in der G_1 - und S-Phase im Vergleich zu der ungestörten Progression aufzuzeigen.

Für diese Untersuchungen wurde den Zellpopulationen gleichzeitig mit der Cisplatin-Gabe Colcemid in Konzentrationen von 0,1 bzw. 0,2 mg/l verabreicht. Die Schwellenkonzentration für die Ausbildung eines kompletten Mitoseblocks liegt zwischen 0,02 und 0,03 mg/l Colcemid (10, 13). Bei den verwendeten Konzentrationen war somit gewährleistet, daß die Zellen nicht in eine zweite Teilungsrunde eintreten konnten. Toxische Effekte auf L-Zellen wurden bei den verwendeten Konzentrationen nicht beobachtet. Die Anwendung dieser Methode mußte auf L-Zellen beschränkt bleiben, da REH Zellen auf Colcemid mit vermehrtem Zellverlust und Bildung von Zelltrümmern reagieren, wodurch eine Interpretation der Histogramme unmöglich wird (13).

2.4.7 BrdU-Methode

Die BrdU-Methode wurde als Verfahren zur flußzytometrischen Bestimmung aller Phasenzeiten vorgestellt (8, 9, 13). Im Gegensatz zur Colcemid-Methode wird bei der BrdU-Methode das Leerlaufen einzelner Kompartimente nicht nach Unterbrechung des Zellzyklus analysiert, sondern nach Änderung der Anfärbbarkeit der DNS bei ungestörter Progression der Zellen im Zellzyklus.

Der sogenannte BrdU-Höchst-Effekt (64) beruht darauf, daß nach Gabe von Bromdesoxyuridin (BrdU), das anstelle des analogen Thymidins in die DNS eingebaut wird, neu synthetisierte, BrdU-haltige DNS nicht mehr mit dem Höchst-Farbstoff

33258 anfärbbar ist, da dieser spezifisch an Thymidin bindet (109). Bis zur Zellteilung bleibt jede Zelle in ihrem Fluoreszenzkompartiment. Die Tochterzellen erscheinen bei der halben Fluoreszenz im Histogramm. Aus den resultierenden Umverteilungen der Kompartimentsinhalte lassen sich die einzelnen Phasenzeiten bestimmen. Abb. 6 verdeutlicht den BrdU-Höchst-Effekt am Beispiel von zwei Zellen, welche sich zum Zeitpunkt der Zugabe des BrdU am Ende der G_1 -Phase (Zelle A) bzw. in der Mitte der S-Phase (Zelle B) befanden.

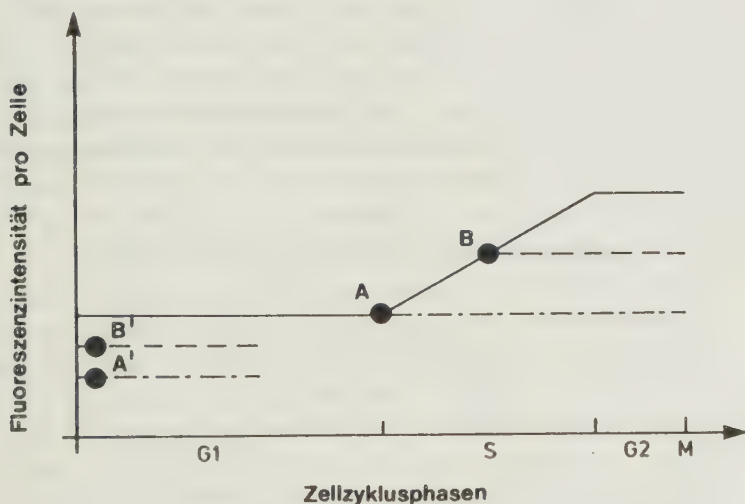


Abb. 6: Anfärbbarkeit zellulärer DNS mit H 33258 nach BrdU-Einbau

Der tatsächliche DNS-Gehalt von 2C der Zelle A verdoppelt sich während ihrer Wanderung durch die S-Phase (—). Dagegen bleibt die nach BrdU-Einbau gemessene H-Fluoreszenz konstant bei 2C (- - - -). Die Tochterzellen A' der Zelle A erscheinen als G_1 -Zellen, obwohl sie einen DNS-Gehalt von 2C besitzen, bei der halben BrdU-gequenchten H-Fluoreszenz (1C). Analog erreicht die Zelle B, die sich zum Zeitpunkt der BrdU-Zugabe

bereits in der S-Phase befindet, während ihres weiteren Laufs durch die S-Phase einen tatsächlichen DNS-Gehalt von 4C (——). Die gemessene BrdU-gequenchte H-Fluoreszenz bleibt ab der BrdU-Zugabe konstant zwischen 2C und 4C (-----). Nach der Zellteilung erscheinen die Tochterzellen B' der Zelle B als G₁-Zellen mit einem wirklichen DNS-Gehalt von 2C bei der halben Fluoreszenzintensität der gemessenen H-Fluoreszenz zwischen 1C und 2C.

Da nach BrdU-Einbau die Menge anfärbbarer DNS bis zur Zellteilung konstant bleibt, und die gewonnenen Histogramme keine Information über die aktuelle Lokalisation der Zellen im Zellzyklus geben können, wurde vorgeschlagen, H-33258 mit einem nicht-Thymidin-spezifischen Farbstoff (Äthidium-Bromid, Propidium-Jodid) zu kombinieren. Nach zweiparametriger Darstellung der DNS-Histogramme kann dann die BrdU-gequenchte H-Fluoreszenz auf der einen Achse und gleichzeitig die dem tatsächlichen DNS-Gehalt entsprechende Fluoreszenz auf der anderen Achse gemessen werden (11, 12, 13).

Während die Bestimmung der Phasenzeiten asynchroner Zellpopulationen nur mit Hilfe aufwendiger Rechenprogramme möglich ist, läßt sich die Proliferationskinetik wachstumsstimulierter Zellen mit der BrdU-Methode leicht und exakt bestimmen. Bietet man den Zellen vor Eintritt der ersten Zellen in die S-Phase BrdU im Nährmedium an, bleibt die H-Fluoreszenz dieser Zellen bis zur Teilung bei 2C. Nach der Teilung erscheinen die Zellen im Histogramm bei der halben Fluoreszenz. Es entstehen zwei diskrete Peaks bei einer Fluoreszenz von 2C und 1C ohne dazwischenliegende S-Phase-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die BrdU-Methode ausschließlich zur Bestimmung der Proliferationskinetik wachstumsstimulierter, Cisplatin-behandelter Zellen eingesetzt. 4 h nach Stimulierung wurde dem Nährmedium eine Mischung von 40 mg/l BrdU (Sigma, Nr. B 5002) und 10 mg/l Desoxycytidin (Sigma, Nr. D 0883) zugegeben. Durch das Desoxycytidin werden die toxischen Effekte des BrdU gemildert (9, 13). Es wurde sorg-

fältig darauf geachtet, daß die Zellproben möglichst geringen Mengen von Licht ausgesetzt waren, da BrdU in der DNS zu einer Sensibilisierung gegenüber UV-Licht führt (14).

Zur Bestimmung der Fluoreszenz wurden die Zellproben mit den in 2.4.3 angegebenen Farbstoffkombinationen gefärbt und die Fluoreszenz in zweiparametriger Darstellung gemessen. Die Entstehung eines solchen zweiparametrigen DNS-Histogramms ist in Abb. 7 schematisch dargestellt. Vor Eintritt der ersten Zellen in die S-Phase ist die Fluoreszenzintensität beider Farbstoffe dem DNS-Gehalt der Zelle proportional (A). Nach Eintritt der Zelle in die S-Phase steigt bei konstanter H-Fluoreszenz die PI- bzw. EB-Fluoreszenz entsprechend der Menge synthetisierter DNS bis auf eine Menge von 4C an (A — B). Nach vollendeter Zellteilung erscheinen die Zellen auf beiden Achsen bei der halben Fluoreszenz (C). Damit hat sich die Ausgangsfluoreszenz des Höchst-Farbstoffs halbiert, die des PI bzw. EB ist wieder genauso groß wie zu Anfang.

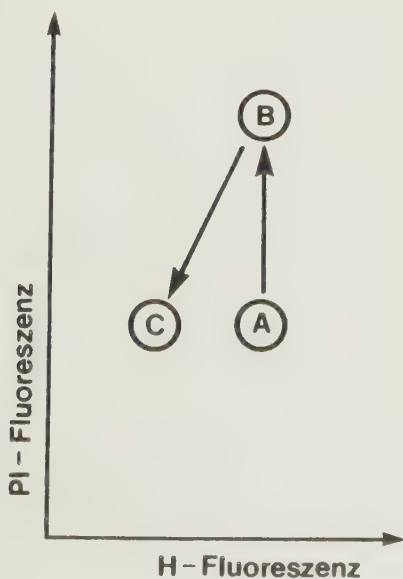


Abb. 7:
Entstehung zweiparametriger
DNS-Histogramme nach Wachstumsstimulation BrdU-inkubierter Zellen und Darstellung durch die H-EB-Methode

Nach Projektion der H-Fluoreszenz auf die H-Achse wurde aus den Peakgehalten der Anteil geteilter Zellen bestimmt:

$$\frac{A}{B - \frac{A}{2}} \times 100 = \% \text{ geteilter Zellen}$$

A: Peakinhalt des neuen 2C-Kompartiments

B: Peakinhalte des alten und des neuen 2C-Kompartiments

Da der BrdU-Höchst-Effekt nur in der ersten Teilungsrunde vollständig ausgebildet ist (13), wurden die Untersuchungen der Proliferationskinetik stimulierter Zellen nur so lange fortgeführt, bis die ersten Zellen in die zweite Teilungsrunde eintraten, da später eine sichere Interpretation der Histogramme nicht mehr gewährleistet war.

3 ERGEBNISSE

3.1 Wachstumshemmende Wirkung des Cisplatin

3.1.1 Abhängigkeit der Wachstumsinhibition von der Cisplatin-Konzentration

Die an L-Zellen ermittelten Dosis-Wirkungskurven zeigten eine deutlich ausgeprägte Schulter bis zu Konzentrationen von 0,005 mg/l Cisplatin. Bis zu Konzentrationen von 1 mg/l verliefen die Kurven annähernd linear und erreichten dann ein Plateau. Erst bei Konzentrationen von mehr als 10 mg/l fielen die Zellzahlen weiter ab.

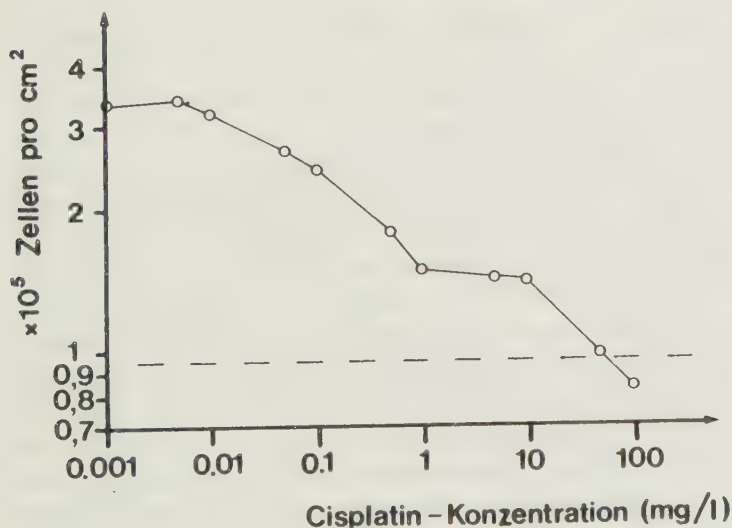


Abb. 8: Dosis Wirkungskurve von Cisplatin an L-Zellen. Zellzahl $\times 10^5$ / cm^2 nach 48 h Cisplatin-Inkubation als Funktion der Cisplatin-Konzentration (mg/l) im Medium.

Abb. 8 zeigt beispielhaft eine der Dosis-Wirkungskurven. Nach 48-stündiger Behandlung exponentiell wachsender L-Zellen mit verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen wurden die Zelldichten ermittelt und als Funktion der Cisplatin-Konzentration im Nährmedium in doppelt logarithmischer Form aufgetragen. Die eingezeichnete durchbrochene Linie entspricht der Zelldichte zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns.

Die an REH-Zellen erstellten Dosis-Wirkungsbeziehungen entsprachen im wesentlichen den an L-Zellen ermittelten. Auch diese Dosis-Wirkungsbeziehungen zeigten Schulterbildung im selben Konzentrationsbereich wie bei L-Zellen. Eine eindeutige Ausbildung des bei L-Zellen beobachteten Plateaus fehlte. Die Dosis-Wirkungskurven besaßen in jenem Konzentrationsbereich lediglich eine deutlich geringere Neigung.

3.1.2 Kinetik der Cisplatin-induzierten Wachstumshemmung

Bei der Erstellung von Wachstumskurven konnte sowohl an L- als auch an REH-Zellen beobachtet werden, daß innerhalb der ersten 6 bis 8 bzw. 4 bis 6 h nach Beginn einer Dauerbehandlung mit verschiedensten Cisplatin-Konzentrationen sich die Zelldichten behandelter Zellpopulationen nicht von denen unbehandelter Kontrollzellpopulationen unterschieden. Erst dann nahmen die Zellzahlen in behandelten Zellpopulationen im Vergleich zu den Kontrollpopulationen entsprechend der applizierten Cisplatin-Konzentration ab. Dieser verzögerte Eintritt der Wachstumshemmung trat auch bei den relativ hohen Konzentrationen von 10 und 20 mg/l Cisplatin auf. Bei diesen Konzentrationen fielen die Zelldichten dann zu späteren Zeiten wieder unter bereits erreichte Werte ab.

In Abb. 9 sind entsprechende Wachstumskurven von L-Zellen dargestellt. Es wurden drei repräsentative Cisplatin-Konzentrationen aus drei verschiedenen Abschnitten der Dosis-Wirkungskurve ausgewählt (0,2 mg/l aus dem linearen Teil,

2 mg/l aus dem Plateau-Bereich, 20 mg/l aus dem zweiten abfallenden Teil). Auf die Darstellung einer Wachstumskurve von Zellen, die mit kleinen Cisplatin-Konzentrationen aus dem Schulterbereich der Dosis-Effektkurve behandelt waren, wurde verzichtet, da sich diese Wachstumskurven nicht von denen unbehandelter Kontrollzellpopulationen unterschieden.

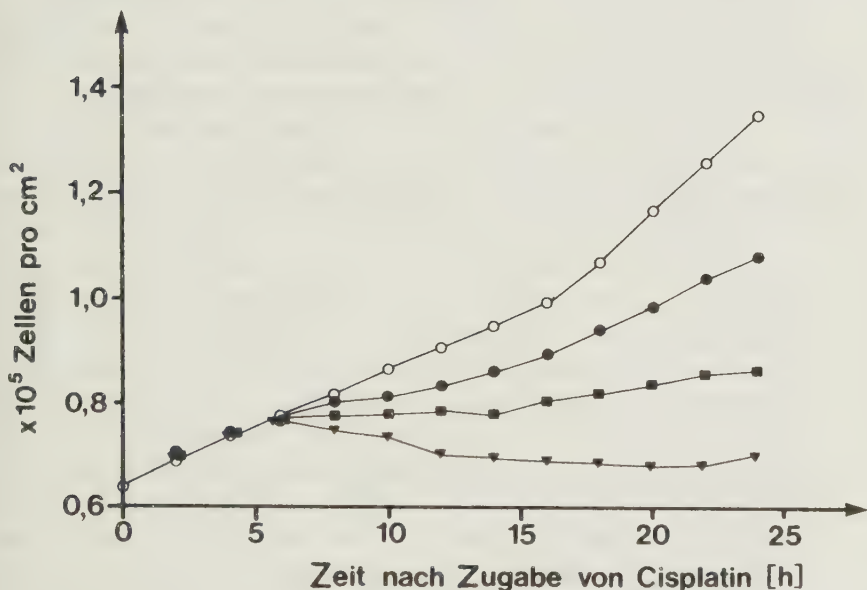


Abb. 9: Wachstumskurven exponentiell wachsender L-Zellen unter Cisplatin-Einfluß; Zellzahl / cm² als Funktion der Behandlungsdauer mit Cisplatin. Cisplatinkonzentrationen: ○ = Kontrolle, ● = 0,2 mg/l, ■ = 2,0 mg/l, ▼ = 20 mg/l.

3.1.3 Langzeitwirkung von Cisplatin auf das Wachstumsverhalten

An REH- und an L-Zellen wurde beobachtet, daß sich trotz fort-dauernder Cisplatin-Behandlung die Steigungen der Wachstums-kurven von Zellen, die mit relativ geringen Cisplatin-Konzen-trationen behandelt wurden, nach einer verzögert eintretenden, passageren Abflachung wieder den Kontrollzellkurven annäher-ten. Dieser Effekt trat bei beiden Zellarten innerhalb dessel-ben Konzentrationsbereiches auf (bis ca. 0,2 mg/l). Er zeigte sich bei L-Zellen im Gegensatz zu REH-Zellen bereits nach Ab-lauf des ersten Zellzyklus. Beide Zellarten behielten die wiedererlangte Wachstumsgeschwindigkeit dann über mehrere Zell-zyklen bei. Abb. 10 zeigt diese Beobachtung anhand einer Verdünnungswachstumskurve von REH-Zellen.

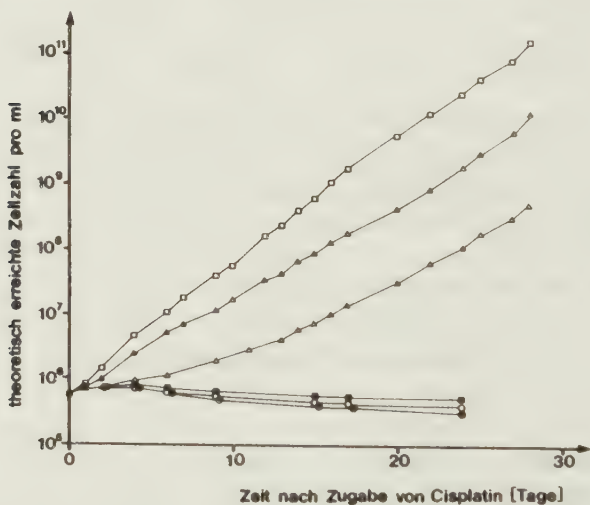


Abb. 10: Verdünnungswachstumskurven von REH-Zellen unter kontinuierlichem Cisplatin-Einfluß. Theoretische Zellzahl/ml als Funktion der Behandlungsdauer mit Cisplatin. Cisplatin-Konzentrationen: $\square$ = Kontrolle, $\blacktriangle$ = 0,1 mg/l, $\triangle$ = 0,2 mg/l, $\blacksquare$ = 0,3 mg/l, $\circ$ = 0,4 mg/l, $\bullet$ = 0,5 mg/l.

Nach Behandlung der Zellen mit höheren Cisplatin-Konzentrationen wurde die verminderte Steigung der Wachstumskurve abhängig von der Konzentration mehr oder weniger lange beibehalten. Dann nahmen die Zellzahlen kontinuierlich ab.

3.2 Wirkung von Cisplatin auf die Progression der Zellen im Zellzyklus

3.2.1 Änderungen der Kompartimentsverteilung innerhalb des ersten Zellzyklus nach Gabe von Cisplatin

Parallel zu den oben dargestellten Wachstumskurven exponentiell wachsender L-Zellen, die einer Dauerinkubation mit verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen unterzogen wurden (Abb.9), wurden die DNS-Fluoreszenzverteilungen in den einzelnen Zellproben bestimmt. Zur Demonstration der qualitativen Veränderungen der Fluoreszenzverteilung unter Cisplatin zeigt Abb. 11 eine Auswahl dieser DNS-Histogramme. 4 h nach Behandlungsbeginn war bei keiner Cisplatin-Konzentration eine auffallende Verschiebung der Phasenanteile erkennbar. Bei einer Konzentration von 0,2 mg/l bildete sich nach 12 h eine deutliche Akkumulation der Zellen in der S- und in der (G_2 +M)-Phase aus. Weitere 12 h später zeichnete sich die Anhäufung der Zellen im 4C-Kompartiment noch deutlicher ab. Bei einer Cisplatin-Konzentration von 2,0 mg/l erfolgte eine deutliche Blockierung der Zellen am Anfang der S-Phase (12 h). Diese Anhäufung schob sich langsam in Richtung höherer Fluoreszenz (G_2 +M) vorwärts (24 h). Bei einer Cisplatin-Konzentration von 20 mg/l ereigneten sich innerhalb des ersten Zellzyklus nach der Schädigung keine ausgeprägten Verteilungsveränderungen: Die Progression der Zellen war in allen Phasen blockiert.

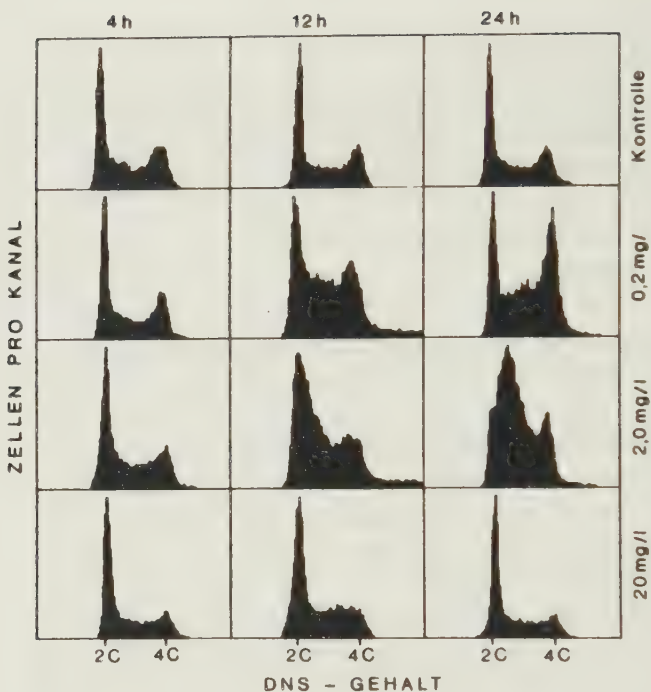


Abb. 11: DNS-Histogramme (H-33258) exponentiell wachsender L-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Cisplatin-Gabe.

Zur Bestimmung der Lokalisation der Blockierung und zur Verdeutlichung des Ausmaßes der jeweiligen Progressionshemmung wurden bei einem Teil der Zellpopulationen unter Anwendung der Colcemid-Methode G_1 - und S-Auslaufkurven aufgenommen.

Auslaufkurven des 2C-Kompartiments (Abb. 12) zeigen eine Hemmung der Progression der Zellen in der G_1 -Phase unter allen verwendeten Cisplatin-Konzentrationen. Während alle Zellen der unbehandelten Kontrollzellpopulation das G_1 -Kompartiment nach 16 h verlassen hatten, leerte sich das G_1 -Kompartiment der mit 0,2 mg/l Cisplatin behandelten Zellen mit ca. 4 h

Verzögerung. Unter einer Behandlung mit 2,0 mg/l waren bereits nicht mehr alle Zellen imstande, von der G_1 -Phase in die S-Phase innerhalb einer Zykluszeit von ca. 22 h überzutreten. Es blieb ein Anteil von 6 % Zellen in der G_1 -Phase. Zellen, die mit 20 mg/l Cisplatin behandelt wurden, erfuhren eine deutliche Blockierung ihrer Progression im Zellzyklus während der G_1 -Phase. Nur etwa ein Viertel der G_1 -Zellen konnte das 2C-Kompartiment verlassen, so daß ein G_1 -Phasenanteil von 30 % bestehen blieb.

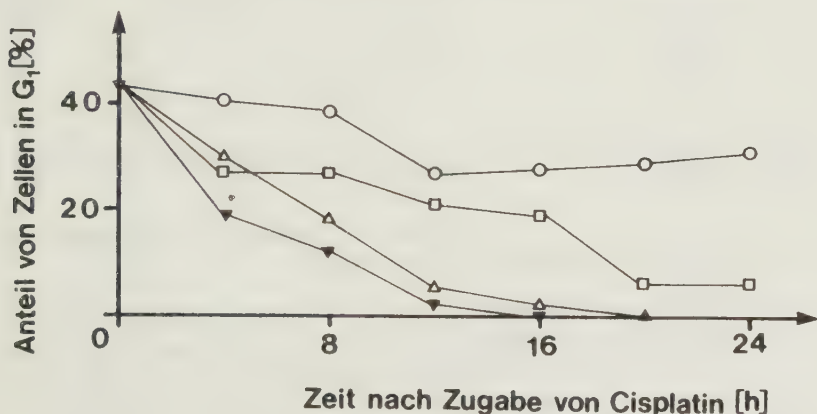


Abb. 12: 2C-Auslaufkurven. Relativer Anteil von G_1 -Zellen als Funktion der Behandlungsdauer mit Cisplatin unter Zugabe von 0,1 mg/l Colcemid bei $t = 0$. Cisplatin-Konzentrationen: ▼ = Kontrolle, Δ = 0,2 mg/l, ◻ = 2,0 mg/l, ○ = 20 mg/l.

S-Phasen-Auslaufkurven sollen die bereits in den Histogramm-bildern (Abb. 11) erkennbare Hemmung der Zellprogression in der S-Phase deutlich machen (Abb. 13). Während innerhalb von 15 h der S-Phasen-Anteil der unbehandelten Kontrollzellen von 40 % auf ca. 10 % abfiel, blieb in dieser Zeit der S-Phasen-Anteil bei allen behandelten Populationen konstant. Im weiteren Verlauf zeigte er bei den Zellpopulationen, die mit höheren Cisplatin-Konzentrationen behandelt wurden, sogar eine Tendenz

zur Vergrößerung. Nur bei Zellen, die mit 0,2 mg/l Cisplatin behandelt wurden, erfolgte wieder eine Abnahme des Anteils von Zellen in der S-Phase.

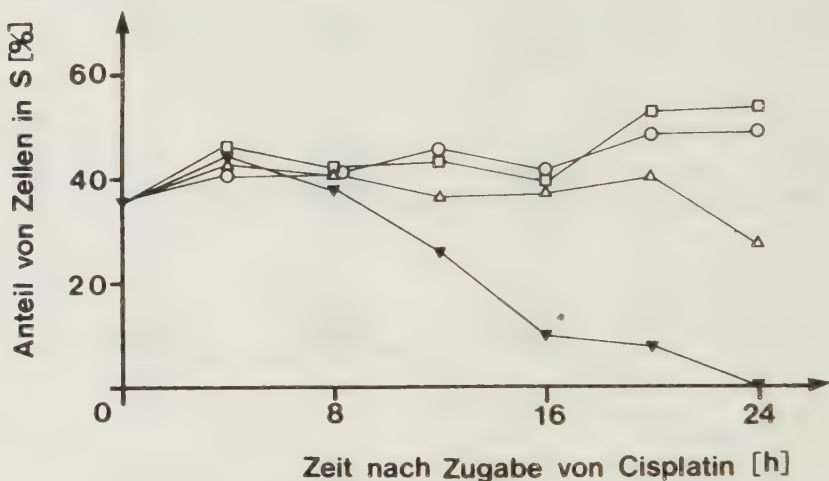


Abb. 13: S-Phasen-Auslaufkurven. Relativer Anteil von S-Phase-Zellen als Funktion der Behandlungsdauer mit Cisplatin nach Zugabe von 0,1 mg/l Colcemid bei $t = 0$. Cisplatin-Konzentrationen: ▼ = Kontrolle, Δ = 0,2 mg/l, ◻ = 2,0 mg/l, ○ = 20 mg/l.

Um eine Hemmung der Progression der Zellen während der (G_2+M)-Phase, die sich in den Histogrammbildern unter der Dosis von 0,2 mg/l abzeichnete (s. Abb. 11), belegen zu können, wurden die relativen Inhalte der 4C-Peaks der nicht mit Colcemid blockierten Zellpopulationen als Funktion der Zeit nach Zugabe von Cisplatin aufgezeichnet (Abb. 14). Nur bei jenen Zellen, die einer Behandlung mit 0,2 mg/l Cisplatin unterzogen wurden, ließ sich die Akkumulation der Zellen im 4C-Kompartiment eindeutig nachweisen. Innerhalb von 24 h stieg der Anteil der (G_2+M)-Zellen in diesen Zellpopulationen von 20 % auf 30 % an. Über die Größenveränderungen des 4C-Komparti-

ments unter dem Einfluß der anderen Cisplatin-Konzentrationen können keine eindeutigen Aussagen gemacht werden.

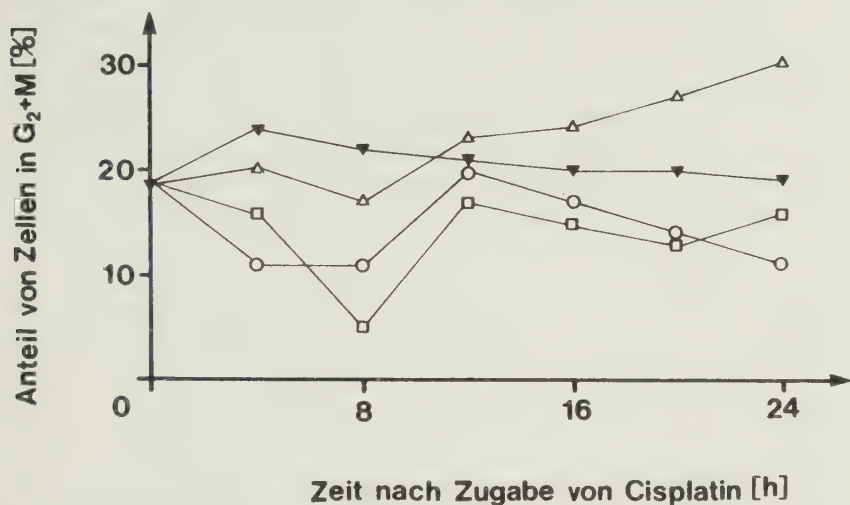


Abb. 14: Relativer Anteil von (G_2+M)-Zellen als Funktion der Behandlungsdauer mit Cisplatin. Cisplatin-Konzentrationen: ▼ = Kontrolle, Δ = 0,2 mg/l, ◻ = 2,0 mg/l, ○ = 20 mg/l.

3.2.2 Zusammenhang zwischen der Hemmung im Zellzyklus und der Wachstumshemmung nach Gabe von Cisplatin

In Abb. 15 wird mit Hilfe von Colcemid die Akkumulation der Zellen im 4C-Kompartiment unter dem Einfluß verschiedener Cisplatin-Konzentrationen anhand von (G_2+M)-Influx-Kurven dargestellt. Die relative Größe des 4C-Kompartiments wird hierbei als Funktion der Zeit nach Behandlungsbeginn aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß der (G_2+M)-Anteil in den Kontrollzellpopulationen annähernd linear zunahm, bis sich nach 24 h alle Zellen im 4C-Kompartiment befanden. Unter einer Behandlung der Zellen mit 0,2 mg/l Cisplatin erfolgte in den

ersten 12 h eine ebenfalls lineare, jedoch geringere Zunahme des Anteils von (G_2+M)-Zellen. Während der folgenden 8 h war der Fluß ins (G_2+M)-Kompartiment unterbrochen, dann jedoch stieg der Anteil von (G_2+M)-Zellen wieder an. Auch die mit 2,0 mg/l Cisplatin inkubierten Zellen zeigten bei noch kleinerer Flußrate eine lineare Akkumulation der Zellen im 4C-Kompartiment, um nach 16 h ein Plateau bei einem (G_2+M)-Phasen-Anteil von 41 - 42 % zu erreichen. Unter einer Behandlung der Zellen mit 20 mg/l Cisplatin sistierte der Fluß in das (G_2+M)-Kompartiment nahezu völlig.

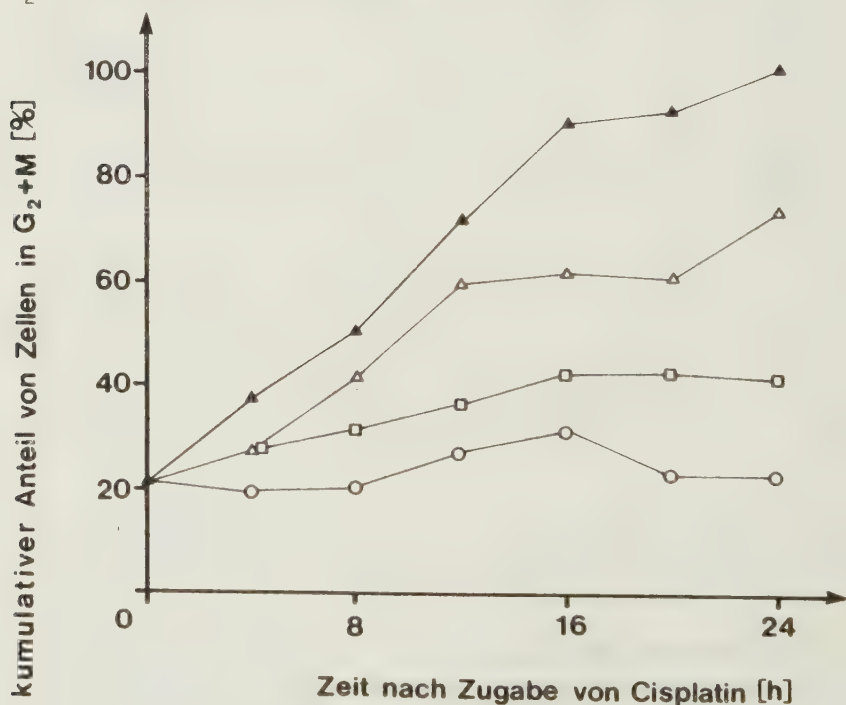


Abb. 15: (G_2+M)-Influx-Kurve. Anteil von (G_2+M)-Zellen als Funktion der Behandlungsdauer mit Cisplatin unter Zugabe von 0,1 mg/l Colcemid bei $t = 0$. Cisplatin-Konzentrationen: ▲ = Kontrolle, △ = 0,2 mg/l, □ = 2,0 mg/l, ○ = 20 mg/l.

Zum Vergleich der mit verschiedenen Methoden ermittelten Cisplatin-Wirkung ist in Tab. 2 das Ausmaß der Cisplatin-induzierten Wachstumshemmung dem Ausmaß der Cisplatin-induzierten Hemmung der Progression der Zellen im Zellzyklus gegenübergestellt.

Der Dauer eines Zellzyklus etwa entsprechend wurde nach 24-stündiger Behandlung der Zellen die relative Wachstumshemmung der behandelten Zellpopulationen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollpopulationen ermittelt:

$$\% \text{ Wachstumshemmung} = \left(1 - \frac{N(B\ 24)}{N(K\ 24)}\right) \times 100$$

$N(B\ 24)$ = Zelldichte behandelter Zellpopulationen nach 24-stündiger Behandlung

$N(K\ 24)$ = Zelldichte der Kontrollzellpopulationen nach 24 h

Aus den (G_2+M) -Influx-Kurven (s. Abb. 15) wurde die relative Hemmung der Progression im Zellzyklus der behandelten Zellpopulationen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellpopulationen errechnet:

$$\% \text{ Progressionshemmung} = \left(1 - \frac{\% (G_2+M)(B\ 24)}{\% (G_2+M)(K\ 24)}\right) \times 100$$

$\% (G_2+M)(B\ 24)$ = Anteil von (G_2+M) -Zellen nach 24 stündiger Behandlung

$\% (G_2+M)(K\ 24)$ = Anteil von (G_2+M) -Zellen in den Kontrollzellpopulationen nach 24 h

Tat. 2: Vergleich der mit verschiedenen Methoden gewonnenen Ergebnisse zur Cisplatin-induzierten Wachstumshemmung.

Cisplatin-Konzentration (mg/l)	Wachstumshemmung (%):	
	aus Wachstumskurven	aus 4C-Influx-Kurven
0,2	26	27
2,0	58	59
20	87	77

3.2.3 Veränderungen der DNS-Histogramme unter langfristiger Behandlung mit Cisplatin

Unter einer Cisplatin-Dauerbehandlung zeichnete sich eine deutliche Tendenz zur Umbildung und zum Teil auch zur Rückbildung der Änderungen der Fluoreszenzverteilung ab, die innerhalb des ersten Zellzyklus nach Setzen des Schadens entstanden waren. Abb. 16 zeigt eine Auswahl repräsentativer DNS-Histogramme von L-Zellen, die einer Dauerbehandlung mit 2,0 mg/l Cisplatin ausgesetzt waren bei einem Behandlungsbeginn während der exponentiellen Wachstumsphase. Ab dem 7. Tag wurden die Histogrammbilder mit der halben Verstärkung der Fluoreszenzintensität aufgenommen. Zum Vergleich sind jeweils die entsprechenden DNS-Histogramme unbehandelter Kontrollzellen abgebildet.

Die Akkumulation der Zellen in der S-Phase (s. Abb. 11) blieb bis zum 2. Tag bestehen. Dann jedoch schienen die Zellen die S-Phase zu verlassen, um sich im 4C-Kompartiment zu sammeln (5. Tag). Auch diese Ansammlung der Zellen in (G_2 +M) war nicht

persistent. Zum einen weist das Wiederauftauchen eines 2C-Peaks am 7. Tag darauf hin, daß wieder reguläre Zellteilungen stattfanden. Zum anderen zeichnete sich bereits am 7. Tag ein Wachstum zu höherer Ploidie ab. Am 15. Tag war neben den 2C- und 4C-Peaks deutlich ein 8C-Peak vorhanden. Sowohl die Fraktion von G_1 -Zellen als auch die von hyperploiden Zellen blieben im folgenden bis zum 19. Tag erhalten.

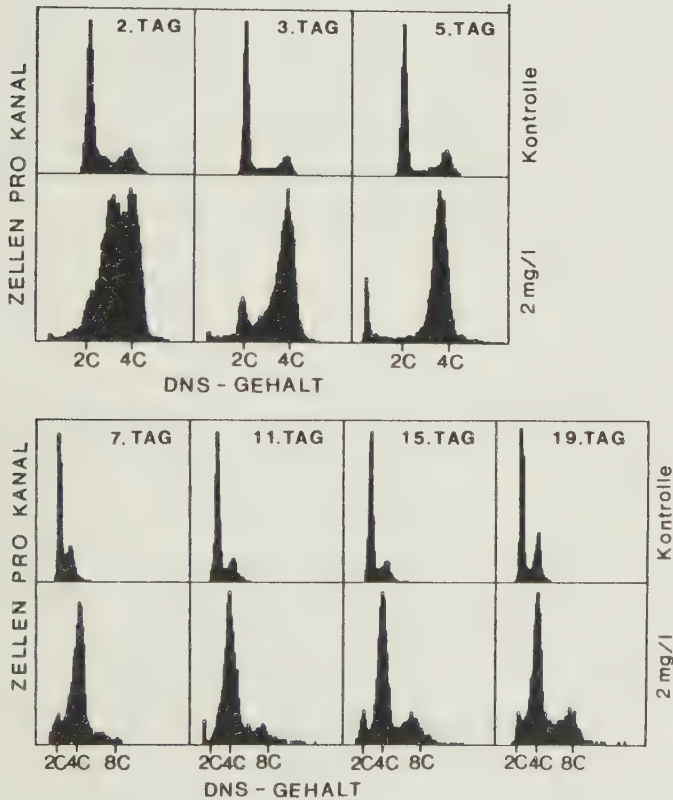


Abb. 16: DNS-Histogramme von L-Zellen (H - 33258) zu verschiedenen Zeiten nach Beginn einer Behandlung mit 2,0 mg/l Cisplatin.

Auch das mikroskopische Bild der Zellen deutete auf ein Wachstum zu höherer Ploidie hin: etwa 5 Tage nach Behandlungsbeginn waren immer Zellen zu sehen, die sich durch ihre enorme Größe von den sie umgebenden, normal großen Zellen unterschieden.

Parallel zu der Aufnahme der DNS-Histogramme wurden die Wachstumskurven dieser Zellen erstellt (Abb. 17). Kontrollzellen, deren Wachstumskurve nicht abgebildet ist, erreichten nach exponentiellem Wachstum ein Plateau von $5,3 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 am 7. Tag. An der Wachstumskurve der behandelten Zellen ist auffallend, daß nach einem initialen Anstieg und anschließend einer stetigen Abnahme der Zellzahlen bis zum 9. Tag die Zelldichten in den 10 darauffolgenden Tagen konstant blieben. Eindeutige Verbindungen zwischen den Ereignissen in den einzelnen Zellzyklusphasen, z. B. Wiederauftauchen des 2C-Peaks am 7. Tag, und dem Wachstumsverhalten lassen sich jedoch nicht darstellen.

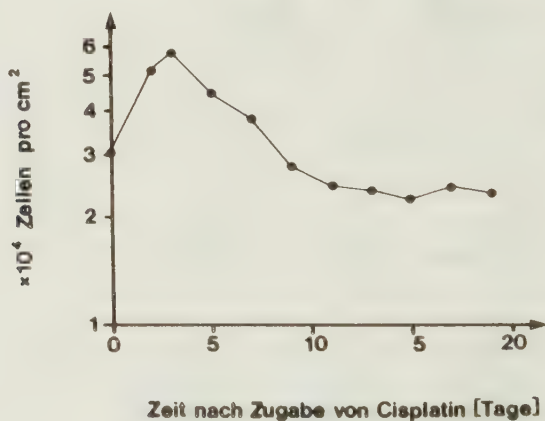


Abb. 17: Wachstumskurve von L-Zellen. Zellzahl/cm² in Abhängigkeit von der Zeit nach Behandlungsbeginn mit 2,0 mg/l Cisplatin.

3.3 Erholungsfähigkeit von Zellen nach zeitlich begrenzter Behandlung mit Cisplatin

3.3.1 Erholungsfähigkeit behandelter L-Zellen

Da nach einstündiger Behandlung der Zellen mit 2,0 mg/l Cisplatin sowohl die induzierte Hemmung des Zellwachstums als auch die Veränderungen der Fluoreszenzverteilung (Ansammlung der Zellen in S und in (G_2 +M)) deutliche Rückbildungstendenz zeigten, wurden die Zellen auch nach längerer Behandlungsdauer (8 h bzw. 24 h) über längere Zeit beobachtet.

Wie aus Abb. 18a und 18b zu erkennen ist, konnten sich nach einstündiger Behandlung der Zellen die Cisplatin-induzierten Veränderungen vollkommen zurückbilden. Die Wachstumskurve der behandelten Zellen besaß dieselbe Steigung wie die der unbehandelten Kontrollpopulationen. Das erreichte Wachstumsplateau lag in behandelten Zellpopulationen auf derselben Höhe wie bei den Kontrollzellen. Auch die Änderungen der Fluoreszenzverteilung hatten sich bis zum 2. Tag (48 h nach Behandlungsbeginn) vollständig zurückgebildet. Erneute Veränderungen der Fluoreszenzverteilungen als Ausdruck einer Cisplatin-induzierten Schädigung der Zellen in einer Tochtergeneration traten bis zum 10. Tag nicht auf.

Während sich nach 8-stündiger Behandlung der Zellen in den Wachstumskurven (Abb. 18a) keinerlei Erholungstendenzen abzeichneten (die Zellzahlen blieben nach einem initialen Anstieg 10 Tage lang konstant), bildeten sich die Veränderungen der Fluoreszenzverteilung innerhalb der 10 Tage fast vollständig zurück. Bereits am 2. Tag hatte sich die Akkumulation der Zellen in der S-Phase aufgelöst. Die Zellen sammelten sich in (G_2 +M). Am 6. Tag tauchte eine nicht allzu kleine Fraktion von 2C-Zellen auf, was auf das Stattfinden teilweise ungestörter Zellteilungen hinweist. Bis zum 10. Tag näherten sich die Fluoreszenzverteilungen denjenigen unbehandelter Zellen immer mehr an.

Obwohl sich nach 24-stündiger Behandlung der Zellen die Wachstumskurve dieser Zellen nur unwesentlich von derjenigen dauernd behandelter Zellen unterschied, und auch in den Histogrammen nach 10 Tagen noch deutliche Veränderungen zu sehen waren, gaben die beobachteten Umverteilungen der Zellen (Auftauchen neuer G_1 -Zellen, Ausbildung eines zweiten S-Phase Blocks, s. Abb. 18b) Veranlassung, derartig behandelte Zellen über einen noch längeren Zeitraum zu beobachten.

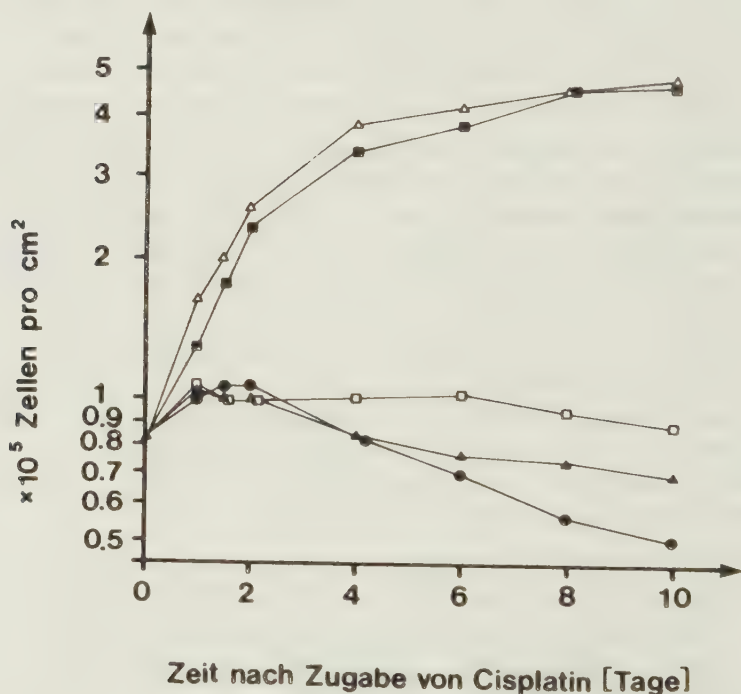


Abb. 18a: Wachstumskurven von L-Zellen. Zellzahl/cm² als Funktion der Zeit nach Behandlungsbeginn. Behandlung der exponentiell wachsenden Zellen mit 2,0 mg/l Cisplatin über ■ = 1 h, □ = 8 h, ● = 24 h, ▲ = kontinuierlich. Δ = unbehandelte Kontrolle.

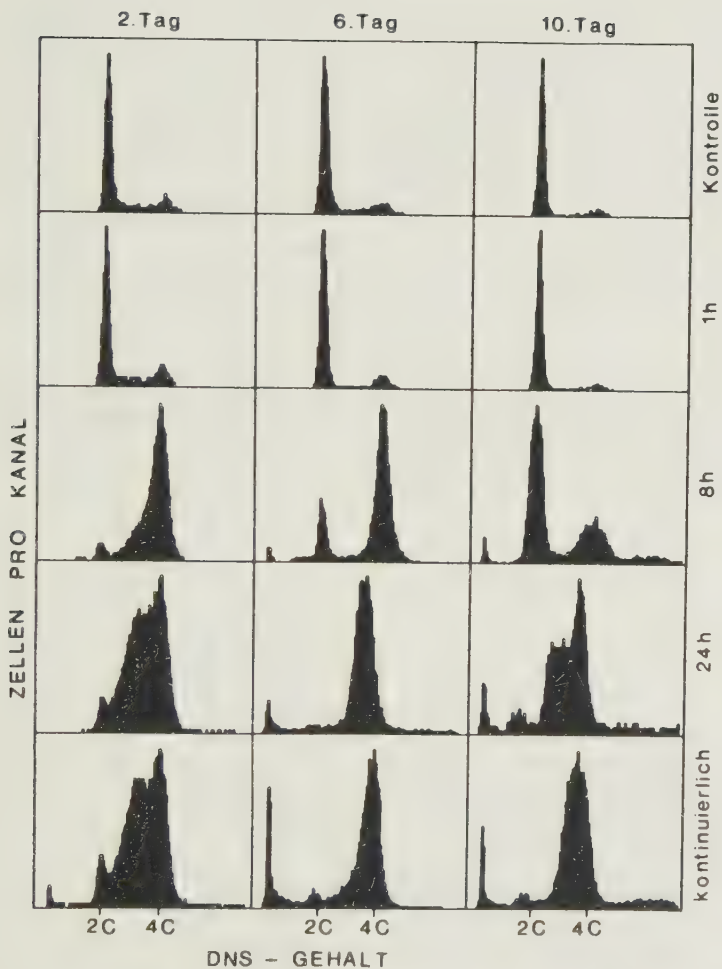


Abb. 18b: DNS-Histogramme von L-Zellen (H-33258) zu verschiedenen Zeiten nach Beginn einer Behandlung mit 2,0 mg/l Cisplatin bei einer Behandlungsdauer von 1 h, 8 h, 24 h und kontinuierlicher Behandlung.

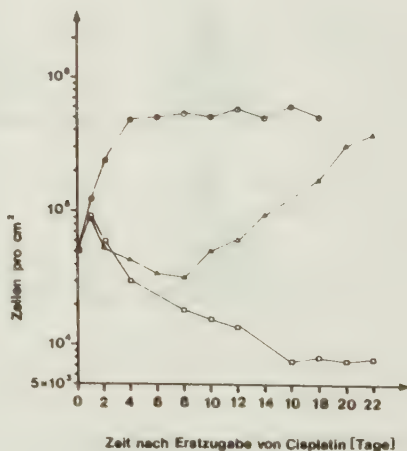
In mehreren Langzeitexperimenten konnte beobachtet werden, daß L-Zellen auch nach 24-stündiger Behandlung nach einer Cisplatin-freien Zeit von 7 bis 10 Tagen die Fähigkeit zur Proliferation wiedererlangten. Abb. 19 zeigt Wachstumskurven aus einem dieser Experimente. Neben der Wachstumskurve von Zellen, die 24 h mit 2,0 mg/l Cisplatin behandelt worden waren, sind zum Vergleich die Wachstumskurven unbehandelter Kontrollzellen sowie solcher Zellen aufgezeigt, die einer Dauerbehandlung mit 2,0 mg/l Cisplatin unterzogen wurden.

Nach einem initialen Anstieg nahmen die Zellzahlen in den behandelten Zellpopulationen kontinuierlich ab. Während bei dauernd behandelten Zellpopulationen die Abnahme der Zellzahlen bis zum 10. Tag andauerte, stiegen die Zellzahlen in den für 24 h behandelten Zellpopulationen ab dem 8. Tag exponentiell. Die Populationsverdopplungszeit war jedoch erheblich länger als in unbehandelten Zellpopulationen während der exponentiellen Wachstumsphase.

Abb. 19:

Wachstumskurven von L-Zellen unter befristeter und kontinuierlicher Behandlung mit 2,0 mg/l Cisplatin. Zellzahl pro cm^2 als Funktion der Zeit nach Behandlungsbeginn.

- = unbehandelte Kontrolle,
- ▲ = 2,0 mg/l für 24 h,
- = 2,0 mg/l dauernd.



L-Zellen zeigten eindeutig die Fähigkeit, sich von der durch Cisplatin hervorgerufenen Schädigung zu erholen. Mit zunehmender Zeit nach Beendigung einer Behandlung mit 2,0 mg/l für 24 h stieg das Proliferationsvermögen der behandelten Zellen. In einer Abwandlung von Koloniebildungstests wurde das Proliferationsvermögen derartig behandelter Zellen untersucht. Zu verschiedenen Zeiten nach Behandlungsende wurden die Zellen zu normaler Dichte ausgesät. Nach 4 Tagen wurde die Anzahl vollendeter Populationsverdopplungen bestimmt. In Abb. 20 ist diese als Funktion des behandlungsfreien Intervalls aufgetragen.

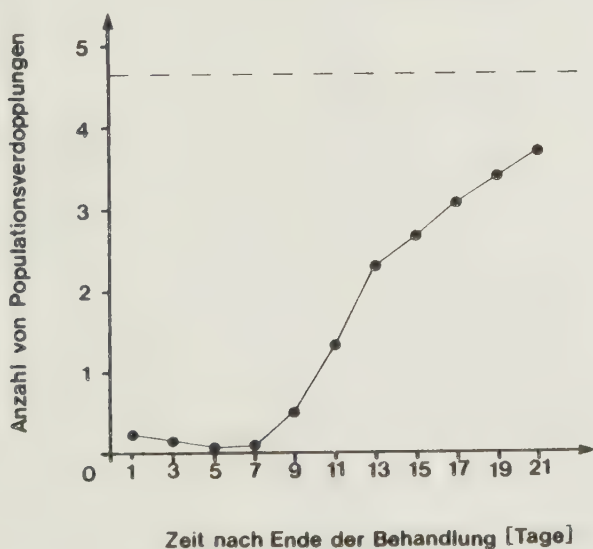


Abb. 20: Anzahl innerhalb von 4 Tagen vollendeter Populationsverdopplungen Cisplatin-behandelter L-Zellen (2,0 mg/l für 24 h) als Funktion der Dauer des behandlungsfreien Intervalls. ----- = Mittel der von Kontrollzellen vollendeten Populationsverdopplungen.

Es wird deutlich, daß, entsprechend den Ergebnissen der Wachstumskurven (Abb. 19), nach einem Intervall von 7 Tagen das Proliferationsvermögen der Zellen mit zunehmender Zeit nach Behandlungsende zunahm. Die Anzahl der vollendeten Populationsverdopplungen lag jedoch immer unter der unbehandelten Kontrollpopulationen (unterbrochene Linie). In Zellpopulationen, die einer Dauerbehandlung mit 2,0 mg/l Cisplatin unterzogen wurden, lagen die Zelldichten nach 4 Tagen stets unter den Ausgangszelldichten.

3.3.2 Erholungsfähigkeit von REH-Zellen

Auch REH-Zellen waren imstande, eine durch zeitlich befristete Cisplatin-Behandlung induzierte Hemmung des Zellwachstums zu überwinden.

Während eine Dauerbehandlung von REH-Zellen mit Cisplatin-Konzentrationen von 0,3 mg/l bereits zu einer endgültigen Stagnation der Zellzahlen führte (Abb. 21 , s.a. Abb. 10), konnte eine auf 24 h beschränkte Behandlung mit Cisplatin-Konzentrationen bis zu 1 mg/l nur eine vorübergehende Hemmung des Zellwachstums bewirken. Aus den Verdünnungswachstumskurven dieser Zellen (Abb. 21) ist zu erkennen, daß nach einer passageren Abflachung die Kurven wieder die Steigung der Wachstumskurven unbehandelter Kontrollzellpopulationen erreichten. Ausmaß und Dauer der Abflachung, und somit Dauer des für die Erholung benötigten Cisplatin-freien Intervalls, waren von der applizierten Cisplatin-Konzentration abhängig. Die wiedererlangte Steigung der Wachstumskurve wurde, wie sich in anderen Experimenten zeigte, jeweils über mehr als 4 Wochen beibehalten. Oberhalb einer Cisplatin-Konzentration von 2,0 mg/l traten auch bei noch längerer Dauer des Cisplatin-freien Intervalls als bei dem dargestellten Zeitraum keine erneute Zunahme der Zelldichte auf. Nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit Cisplatin-Konzentrationen unter 0,1 mg/l entsprachen die Wachstumskurven denjenigen unbehandelter Kontrollzellen.

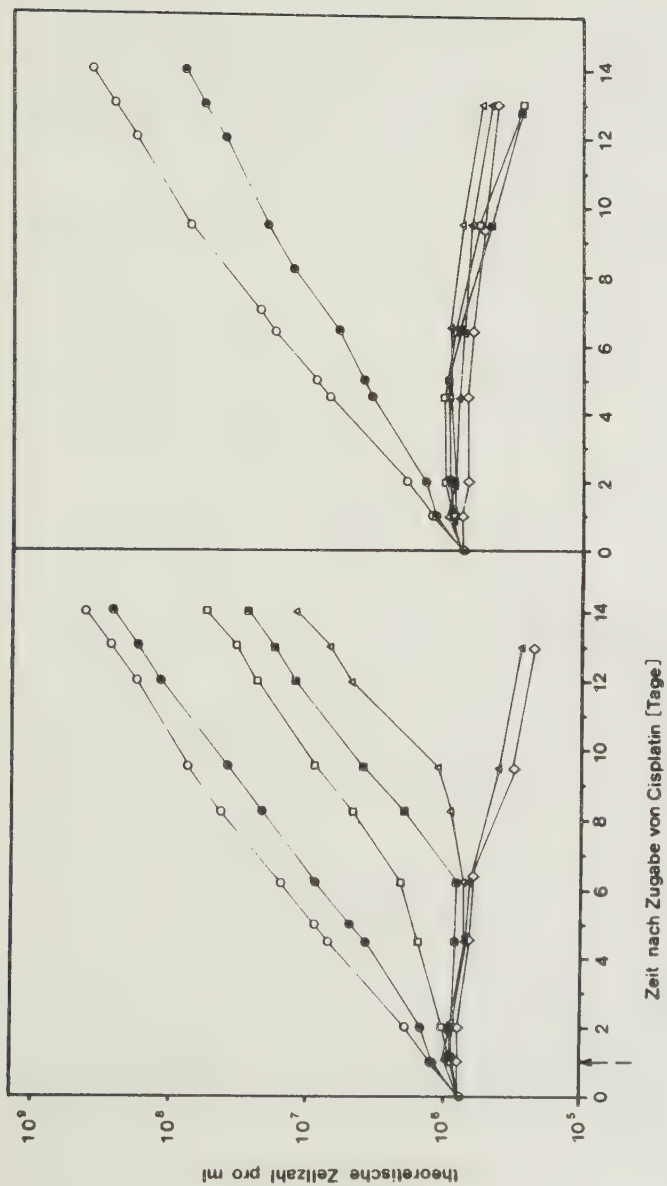


Abb. 21: Verdünnungswachstumskurven von REH-Zellen. Theoretische Zellzahl/ml als Funktion der Zeit nach Behandlungsbeginn. Linke Bildhälfte: 24 h Behandlungsdauer, rechte Bildhälfte: Dauerbehandlung. Cisplatin-Konzentrationen: ○ = Kontrolle, ● = 0,1 mg/l, □ = 0,3 mg/l, ■ = 0,5 mg/l, △ = 1,0 mg/l, ◇ = 2,0 mg/l, ↑ = Ende der Behandlung.

Aus den in Abb. 22 dargestellten Verdünnungswachstumskurven wird deutlich, daß die Zeit, die REH-Zellen benötigen, um nach einer zeitlich befristeten Cisplatin-Behandlung wieder die Proliferationsgeschwindigkeit unbehandelter Kontrollzellen zu erreichen, bei konstanter Cisplatin-Konzentration von der Behandlungsdauer abhing.

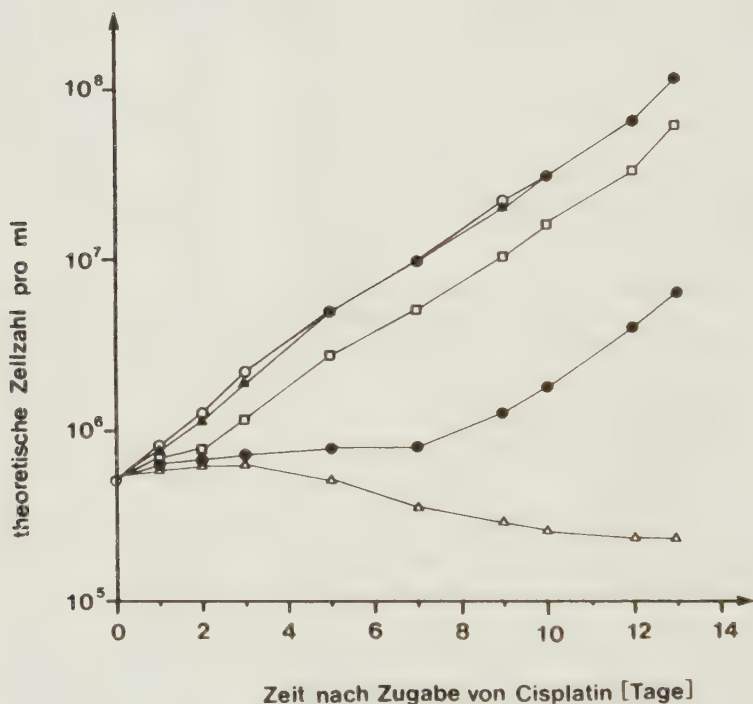


Abb. 22: Verdünnungswachstumskurven von REH-Zellen. Theoretische Zellzahl/ml als Funktion der Zeit nach Behandlungsbeginn mit 1,0 mg/l Cisplatin. Behandlungsdauer: ○ = Kontrolle, ▲ = 1 h, □ = 8 h, ● = 24 h, △ = kontinuierlich.

Einstündige Behandlung der Zellen mit 1,0 mg/l Cisplatin zeigte keinen meßbaren Effekt auf das Wachstumsverhalten der Zellen. Die Verdünnungswachstumskurven dieser Zellen entsprachen denjenigen unbehandelter Kontrollzellen. Bei REH-Zellen, die 8 h mit 0,1 mg/l Cisplatin behandelt wurden, erreichte die Wachstumskurve nach einer vorübergehenden Abflachung bereits nach einer Cisplatin-freien Zeit von ca. 40 h wieder die Steigung der Kontrollzellkurve. Nach einer 24-stündigen Cisplatin-Behandlung zeigten die Zellpopulationen konstante Zellzahlen bis zum 7. Tag. Erst dann stiegen die Zellzahlen wieder an. Ab dem 10. Tag verlief auch diese Wachstumskurve parallel zu der Verdünnungswachstumskurve unbehandelter Kontrollzellen.

3.4 Wirkung von Cisplatin auf den Übergang von ruhenden Zellen ins proliferative Stadium

3.4.1 Abhängigkeit des Teilungsverhaltens von der Cisplatin-Konzentration

Mit Hilfe der BrdU-Methode wurde die Teilungskinetik von L-Zellen innerhalb des ersten Zellzyklus nach Stimulierung unter der Einwirkung verschiedener Cisplatin-Konzentrationen untersucht. Die Zugabe des Cisplatin erfolgte unmittelbar nach der Stimulierung.

Abb. 23 zeigt eine Schar von Teilungskurven dieser Zellen. Die aus den H-33258-Fluoreszenzverteilungen ermittelten Anteile von geteilten Zellen sind als Funktion der Zeit nach Stimulierung dargestellt. Es ist zu erkennen, daß selbst die geringe Cisplatin-Konzentration von 0,002 mg/l einen meßbaren Effekt auf die Teilungskinetik stimulierter L-Zellen besaß. Bis zu einer Cisplatin-Konzentration von 0,16 mg/l sind die Teilungskurven auf der Zeitachse in Richtung späterer Zeiten lediglich parallel verschoben. Mit zunehmender Cisplatin-Konzentration verlängerte sich das Intervall zwischen Stimu-

lierung und den ersten Zellteilungen. Die Zahl der dann pro Zeiteinheit stattfindenden Zellteilungen entsprach jedoch den Werten unbehandelter Kontrollzellen. Ab einer Konzentration von 0,2 mg/l ist neben der Verschiebung auf der Zeitachse auch eine verminderte Steigung der Kurven zu erkennen. Durch eine zusätzliche Schädigung schien eine, zumindest vorübergehende, Verhinderung der Zellteilung bewirkt zu werden.

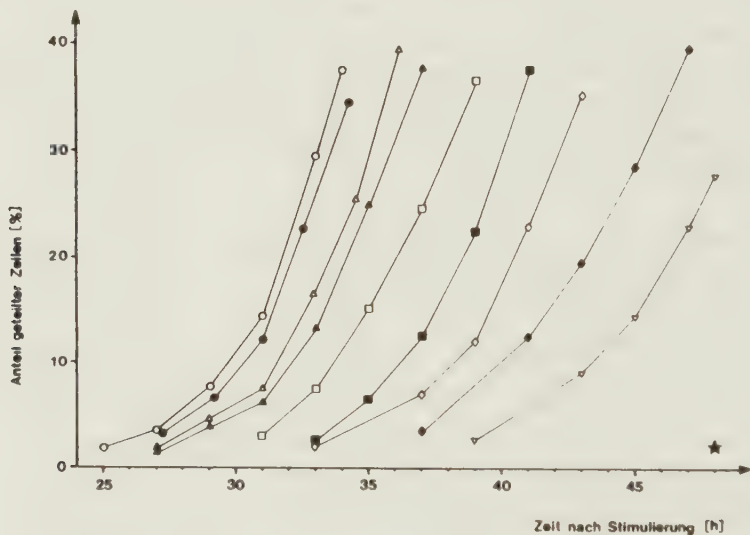


Abb. 23: Teilungskurven stimulierter L-Zellen unter dem kontinuierlichen Einfluß verschiedener Cisplatin-Konzentrationen. Behandlungsbeginn unmittelbar nach der Stimulierung. Relativer Anteil geteilter Zellen als Funktion der Zeit nach Stimulierung. Wachstum in BrdU-Medium. Cisplatin-Konzentrationen: ○ = Kontrolle, ● = 0,002 mg/l, △ = 0,020 mg/l, ▲ = 0,040 mg/l, □ = 0,080 mg/l, ■ = 0,120 mg/l, ◇ = 0,160 mg/l, ◆ = 0,200 mg/l, ▽ = 0,500 mg/l, ★ = 1,000 mg/l.

Aus den Histogrammbildern ging hervor, daß sich ein Großteil der mit höheren Cisplatin-Konzentrationen behandelten Zellen in der S- und später in der (G_2 +M)-Phase gesammelt hatten. In stichprobenartigen Messungen zu sehr viel späteren Zeiten als dem aufgezeigten Zeitraum wurde jedoch beobachtet, daß auch diese Blockierungen nicht endgültig waren. Bei einer Cisplatin-Konzentration von 1 mg/l konnten alle Zellen die Zellteilung innerhalb von 9 Tagen vollenden. Auch unter einer Cisplatin-Behandlung mit 2 mg/l konnten die Zellen in den Zellzyklus eintreten. Sie wurden jedoch in der S- und auch in der (G_2 +M)-Phase mit hoher Effizienz blockiert, so daß Zellteilungen während des ganzen Beobachtungszeitraumes nicht stattfanden.

3.4.2 Abhängigkeit der Hemmung der Teilungskinetik von der Behandlungsdauer

Neben der Abhängigkeit der Cisplatin-induzierten Verzögerung der Teilungskinetik von der Cisplatin-Konzentration wurde eine eindeutige Abhängigkeit des Ausmaßes der Teilungshemmung von der Behandlungsdauer beobachtet.

Mit Hilfe der BrdU-Methode wurde die Teilungskinetik von L-Zellen beobachtet, die nach der Stimulierung verschieden lange mit 0,2 mg/l Cisplatin behandelt wurden. Abb. 24 zeigt die Schar von Teilungskurven dieser Zellpopulationen. Für die einzelnen Behandlungsdauern ist der prozentuale Anteil geteilter Zellen als Funktion der Zeit nach Stimulierung dargestellt. Mit zunehmender Behandlungsdauer werden die Kurven auf der Zeitachse zu späteren Zeiten verschoben. Erste Zellteilungen fanden verspätet statt, jedoch entsprach die Zahl der sich dann pro Zeiteinheit teilenden Zellen derjenigen in unbehandelten Zellpopulationen. Bereits eine 16-stündige Behandlung der Zellen reichte aus, um Effekte hervorzurufen, wie sie einer Dauerbehandlung entsprachen.

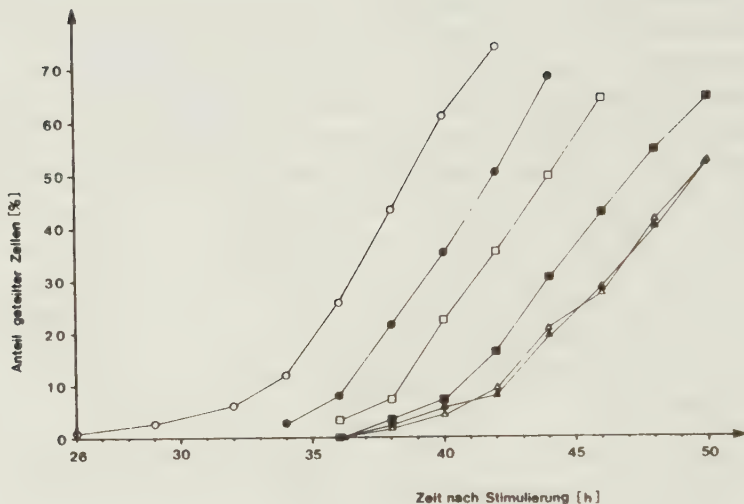


Abb. 24: Teilungskurven stimulierter L-Zellen: prozentualer Anteil geteilter Zellen als Funktion der Zeit nach Stimulierung. Wachstum in BrdU-Medium. Behandlung mit 0,2 mg/l Cisplatin, Behandlungsbeginn unmittelbar nach der Stimulierung. Behandlungsdauer: ● = 4 h, □ = 8 h, ■ = 12 h, △ = 16 h, ▲ = kontinuierlich, ○ = Kontrolle.

3.4.3 Abhängigkeit der Teilungshemmung von der Cisplatin-Konzentration bei Behandlung der Zellen vor der Stimulierung

Bei Behandlung der L-Zellen vor der Stimulierung konnten ähnliche Effekte beobachtet werden wie bei Behandlung der Zellen nach der Stimulierung.

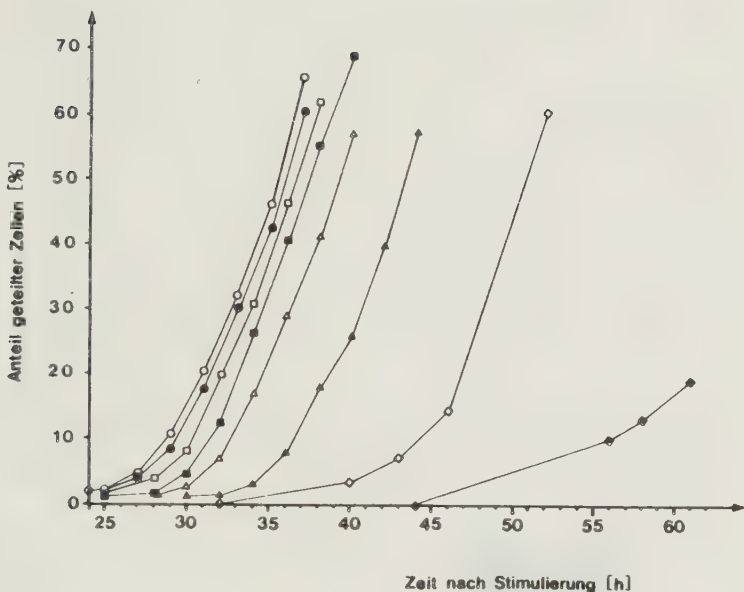


Abb. 25: Teilungskurven stimulierter L-Zellen: prozentualer Anteil geteilter Zellen als Funktion der Zeit nach Stimulierung bei 24 h Behandlung der Zellen mit verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen unmittelbar vor der Stimulierung. Wachstum in BrdU-Medium. Cisplatin-Konzentrationen: ● = 0,002 mg/l, □ = 0,020 mg/l, ■ = 0,100 mg/l, △ = 0,200 mg/l, ▲ = 0,500 mg/l, ◇ = 1,000 mg/l, ◆ = 2,000 mg/l, ○ = Kontrolle.

Aus den Teilungskurven ist zu erkennen, daß nach 24-stündiger Behandlung der Zellen unmittelbar vor der Stimulierung der Zeitpunkt, an dem die ersten Zellen ihre Zellteilungen vollendet hatten, mit zunehmender Cisplatin-Konzentration zu späteren Zeiten verschoben wurde. Meßbare Effekte traten auch hier bereits bei Konzentrationen von 0,002 mg/l auf. Mit steigender Cisplatin-Konzentration wurden die Kurven auf der Zeitachse zu späteren Zeiten verschoben, jedoch blieben die

Steigungen der Kurven, d. h. die Menge der sich pro Zeiteinheit teilenden Zellen, bis hinauf zu Konzentrationen von 1,0 mg/l konstant. Erst bei einer Cisplatin-Konzentration von 2,0 mg/l, bei welcher im Gegensatz zu den nach der Stimulierung behandelten Zellpopulationen Zellteilungen noch in nennenswertem Umfang stattfanden, zeigt die Teilungskurve eine deutlich geringere Steigung.

Aus den zweiparametrischen Darstellungen der Äthidium-Bromid/H-33258 Fluoreszenzverteilungen von mit 1,0 mg/l bzw. mit 2,0 mg/l behandelten L-Zellen war, wie bei den Zellen, die nach der Stimulierung einer Cisplatin-Behandlung unterzogen wurden, zu erkennen, daß alle Zellen in den Zellzyklus eintreten konnten. Nach langsamer Durchwanderung der S-Phase sammelten sie sich im (G_2+M)-Kompartiment und vollendeten dann entsprechend der Cisplatin-Konzentration mehr oder weniger schnell die Zellteilung (Abb. 26).

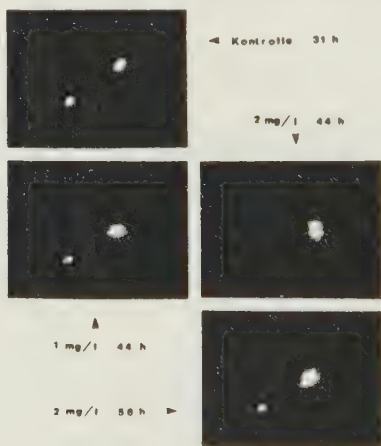


Abb. 26: Zweiparametrische EB/H-33258 Fluoreszenzverteilungen zu verschiedenen Zeiten nach Stimulierung von ruhenden L-Zellen. 24 h Behandlung der Zellen mit 1,0 bzw. 2,0 mg/l Cisplatin unmittelbar vor der Stimulierung. Wachstum in BrdU-Medium.

44 h nach Stimulierung waren nach Behandlung der Zellen mit 1,0 und 2,0 mg/l das ehemalige 2C-Kompartiment und auch die S-Phase fast vollkommen leergelaufen. Die Zellen hatten sich im 4C-Kompartiment gesammelt. Während nach Behandlung der Zellen mit 1,0 mg/l zu diesem Zeitpunkt bereits eine meßbare Fraktion geteilter Zellen vorhanden war, hatten in den mit 2,0 mg/l Cisplatin behandelten Zellpopulationen noch keine Zellteilungen stattgefunden. In dem beobachteten Ausmaß traten diese erst mit ca. 12 h Verzögerung auf. Unbehandelte Kontrollzellen hatten zu diesem Zeitpunkt bereits ihren ersten Teilungszyklus durchlaufen.

3.4.4 Abhängigkeit der Teilungshemmung von der Behandlungsdauer bei Behandlung der Zellen vor der Stimulierung.

Wie der Effekt einer Behandlung der Zellen nach der Stimulierung zeigt auch der einer Behandlung der Zellen vor Stimulierung deutliche Abhängigkeit von der Behandlungsdauer.

Mit zunehmender Behandlungsdauer wurde der Zeitpunkt des Auftretens erster Zellteilungen zu späteren Zeiten verschoben. Die mit Hilfe der ErdU-Methode gewonnenen Teilungskurven ergaben eine parallele Kurvenschar (abb. 27). Es wird deutlich, daß selbst eine einstündige Behandlung ruhender Zellen mit 0,2 mg/l Cisplatin meßbare Wirkung auf die Teilungskinetik dieser Zellen besaß. Auffallend war, daß bei Behandlung der Zellen vor der Stimulierung, im Gegensatz zu Zellen, die nach der Stimulierung behandelt worden waren, sich der Abstand der Teilungskurven mit zunehmender Behandlungsdauer verkleinerte. Es bestand kein linearer Zusammenhang zwischen der Behandlungsdauer und der hervorgerufenen Verzögerung der Zellteilung.

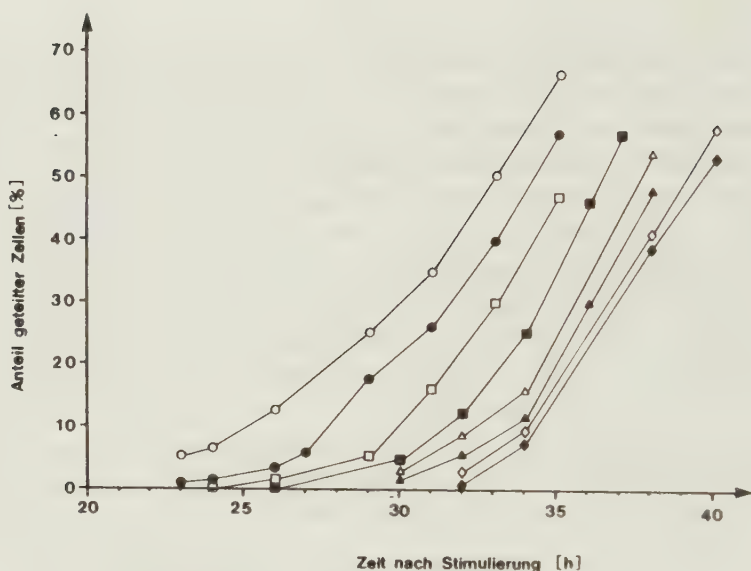


Abb. 27: Teilungskurven stimulierter L-Zellen: prozentualer Anteil geteilter Zellen als Funktion der Zeit nach Stimulierung. Behandlung der Zellen mit 0,2 mg/l Cisplatin unmittelbar vor der Stimulierung. Behandlungsdauer: ● = 1 h, □ = 4 h, ■ = 8 h, △ = 12 h, ▲ = 16 h, ◇ = 20 h, ◆ = 24 h, ○ = Kontrolle.

4. DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methoden: Wachstumskurven im Vergleich zu Koloniebildungstests

Im allgemeinen wird als einzig relevantes Kriterium zur Beurteilung der zytoziden Wirkung eines Zytostatikums die Wirkung der Substanz auf die Repopulationsfähigkeit angesehen, welche mit Hilfe von Koloniebildungstests gemessen wird (86, 29). Im Gegensatz zu Wachstumskurven, die lediglich das integrale Bild des Wachstumsverhaltens einer Zellpopulation zeichnen, wird in Koloniebildungstests das Wachstumsverhalten jeder einzelnen Zelle beobachtet. Obgleich Koloniebildungstests demnach die wesentlich empfindlichere Methode sind, besitzt die Wachstumskurve Vorzüge, welche sie für die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit besser geeignet erscheinen ließen:

1. Findet Zelluntergang in späteren Generationen in nennenswertem Ausmaß statt, kann dieser auch durch Wachstumskurven erfaßt werden, die das Wachstumsverhalten der Zellen über mehrere Generationen hinweg beobachten.
2. Die Kinetik einer Zytostatikum-induzierten Wachstumshemmung, deren Kenntnis für die Erstellung der zeitlichen Therapiepläne von großer Bedeutung ist, kann durch engmaschig geführte Wachstumskurven besser erfaßt werden.
3. Bei der Anwendung der Koloniebildungstests geht die Information über den durch ein Zytostatikum hervorgerufenen, akuten Zelluntergang im System verloren. Geht ein Teil der Zellpopulationen noch während der direkten Einwirkung eines Zytostatikums zugrunde und löst sich durch autolytische Prozesse auf, kann er in Koloniebildungstests dann nicht mehr erfaßt werden. Wenn die überlebenden Zellen, die in den Koloniebildungstests erfaßt werden können, durch das Zytostatikum nur eine geringe Einschränkung ihrer Repopulationsfähigkeit erfahren, wird aufgrund

der Ergebnisse der Koloniebildungstests, trotz vorhandener zytozider Wirkung, auf eine schwache zytostatische Wirkung des untersuchten Pharmakons geschlossen.

4. Bei Anwendung von Koloniebildungstests kann durch eine eventuell größere Empfindlichkeit der durch ein Zytostatikum vorgeschädigten Zellen gegenüber den erforderlichen, langwierigen Manipulationen (Aussaat, Ernte, Wachsvorgänge) und dem erforderlichen Mediumwechsel (Flüssigmedium - Nähragar) eine größere zytostatische Wirkung vorgetäuscht werden.
5. Ein wesentlicher Vorteil von Wachstumskurven ist, daß, im Gegensatz zu Koloniebildungstests, nicht mit einer Schwellensetzung zur Definition einer Kolonie gearbeitet werden muß. Durch die Schwellensetzung wird bei den Koloniebildungstests die Wirkung eines stark proliferationshemmenden, jedoch nicht zytoziden Zytostatikums überbewertet, da die tatsächlich gebildeten Kolonien in ihrer Größe unterhalb der Zählschwelle liegen können, ihre geringe Größe aber nicht durch Zelluntergang, sondern durch langsames aber stetiges Zellwachstum bedingt ist.
6. Bei der Arbeit mit Wachstumskurven ist, im Gegensatz zu der mit Koloniebildungstests, wie sie in der Literatur gefunden werden (5, 7, 19, 25, 26, 29, 32, 34, 35, 38, 39, 53, 72, 74, 75, 78, 80, 83, 85, 95, 105, 107, 114, 116, 118), die Beobachtung der Zellen unter langdauernder, kontinuierlicher Behandlung der Zellen möglich, so daß Vergleiche zwischen der Wirkung einer Dauerbehandlung und einer zeitlich befristeten Behandlung gezogen werden können.
7. Ein weiterer, nicht unbedeutender Vorteil von Wachstumskurven ist, daß sie mit wesentlich geringerem Aufwand von Zeit und Material als Koloniebildungstests durchgeführt werden können.

4.2 Wachstumshemmende Wirkung von Cisplatin

4.2.1 Interpretation der ermittelten Dosis-Wirkungsbeziehungen

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Dosis-Wirkungsbeziehungen stimmen in ihrer Form mit den in der Literatur zu findenden überein (34, 65, 118). Die Verschiebung der Kurven in niedere Konzentrationsbereiche läßt sich als Eigentümlichkeit der verwendeten Zelllinien oder aufgrund der Abhängigkeit der Cisplatin-Wirkung vom Dosis-Zeit-Produkt (5, 25, 26, 74, 85) durch die vergleichsweise lange Behandlungsdauer (48 h im Gegensatz zu 1 bis 2 h) erklären.

Im folgenden soll versucht werden, die vorliegenden Dosis-Wirkungskurven im Rahmen der von Drewinko et al. (29) aufgestellten Klassifikation von Dosis-Wirkungsbeziehungen zu diskutieren.

Drewinko et al. unterscheiden fünf verschiedene Reaktionsmuster von Zellen auf die Behandlung mit einem Zytostatikum, denen fünf Typen von Dosis-Effektkurven entsprechen: einfach exponentielle Kurve, biphasisch exponentielle Kurve, exponentielle Schulterkurve, exponentielle Plateaukurve und die eines wirkungslosen Zytostatikums. Nur Kombinationen dieser verschiedenen Kurventypen können den gesamten Kurvenbereich der ermittelten Cisplatin-Dosis-Wirkungsbeziehungen abdecken.

Im niederen Konzentrationsbereich entspricht sowohl an L- als auch an REH-Zellen die Dosis-Wirkungsbeziehung einer exponentiellen Schulterkurve. Diese ist dadurch charakterisiert, daß bei kleinen Konzentrationen kein meßbarer Zytostatikum-Effekt auf das Proliferationsvermögen festzustellen ist. Oberhalb einer bestimmten Schwellenkonzentration wird eine exponentielle Abnahme der Zellzahlen im System induziert. Im Rahmen der Target-Theorie, die das Vorhandensein einer Anzahl von Struktureinheiten im Zellinnern annimmt, welche durch ihre Aktivität für die Lebensfähigkeit der Zelle ver-

antwortlich sind, spiegelt die Schulter einerseits die Fähigkeit der Targets wieder, eine Schädigung zu kompensieren. Andererseits kann auch durch Inaktivierung einer geringen Anzahl getroffener Targets im niederen Konzentrationsbereich die Ausbildung einer Schulter zustandekommen.

Im überlappenden, höheren Konzentrationsbereich entsprechen die Cisplatin-Dosis-Wirkungsbeziehungen einer biphasisch exponentiellen Kurve (REH-Zellen) bzw. einer exponentiellen Plateaukurve (L-Zellen), wobei jeweils die steilen Kurvenanteile mit den exponentiellen Anteilen der Schulterkurven identisch sind. Biphasisch exponentielle und exponentielle Plateaukurven haben einen steilen Kurvenanteil im niederen Konzentrationsbereich gemeinsam, der dadurch charakterisiert ist, daß selbst geringe Zunahme der Zytostatikum-Konzentration zu einer deutlichen Zunahme der wachstumshemmenden Wirkung führt. Diesem Kurvenanteil folgt ein flacherer bzw. horizontaler Anteil bei höheren Konzentrationen, der dadurch zustande kommt, daß eine Erhöhung der Zytostatikum-Konzentration nur eine geringfügige bzw. keine Steigerung der wachstumshemmenden Wirkung hervorrufen kann. Während die exponentielle Plateaukurve als ein für phasenspezifische Zytostatika typisches Reaktionsmuster angesehen wird, bieten Drowinski et al. zwei Mechanismen zur Erklärung der Entstehung biphasisch exponentieller Reaktionsmuster an:

- Phasenpräferenz des Zytostatikums
- Existenz zweier, verschieden empfindlicher Subpopulationen, die, unabhängig von ihrer Lokalisation im Zellzyklus, mehr oder weniger empfindlich gegen ein Zytostatikum sind.

Bei noch höheren Cisplatin-Konzentrationen zeigt sich eine erneute Abnahme der Zellzahlen. Diese kann dadurch zustandekommen, daß bei diesen Cisplatin-Konzentrationen eine zusätzliche Schädigung auftritt, welche bei kleinen Konzentrationen nicht vorhanden oder durch Wachstumskurven nicht meßbar ist. Ein derartiger Effekt von Cisplatin könnte sich aus der von

Harder und Rosenberg u. a. beschriebenen Wirkung von Cisplatin auf DNS-, RNS- und Proteinsynthese erklären (46, 54, 55, 83). Zu der selektiven DNS-Synthesehemmung bei niederen Konzentrationen kommt bei höheren eine Hemmung der RNS- und Proteinsynthese. Diese könnte eventuell für die Steigerung der wachstumshemmenden Wirkung bei hohen Cisplatin-Konzentrationen verantwortlich sein.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen zeigten Drewinko et al. einen einfach exponentiellen Verlauf der Cisplatin-Dosis-Wirkungskurve. Auch in anderen Arbeiten, die mit Koloniebildungstests arbeiteten, wurden entweder einfache exponentielle oder Schulter-Kurven beobachtet (4, 5, 7, 19, 25, 26, 27, 29, 32, 34, 39, 53, 74, 75, 76, 78, 80, 82, 83, 85, 95, 105, 107, 116, 118). Dies könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, daß die wachstumshemmende Wirkung mit zwei verschiedenen Methoden gemessen wurde, obgleich dies auf das Reaktionsmuster keinen wesentlichen Einfluß ausüben dürfte. Die wahrscheinlichste Erklärung für die Verschiedenartigkeit der Ergebnisse ist darin zu sehen, daß in den oben genannten Arbeiten niemals ein solch breiter Konzentrationsbereich untersucht wurde, so daß die ermittelten Kurven jeweils nur einem Abschnitt der gesamten Dosis-Effektkurve entsprechen.

4.2.2 Kinetik der Wachstumshemmung

Der verzögerte Eintritt der Hemmung der Zellteilung durch Cisplatin bei Zellen in vitro wurde in der Literatur direkt noch nicht beschrieben. Lediglich Ergebnisse von Bergerat et al. (6) zur Mitoserate von behandelten Zellen sprechen für einen zeitlich verzögerten Eintritt der Cisplatin-induzierten Hemmung des Zellwachstums. Im Zusammenhang mit verschiedenen anderen Fragestellungen jedoch wurde ein verzögerter Wirkungseintritt bei Cisplatin beobachtet. Cisplatin-induzierte DNS-Vernetzungen (32, 34, 78, 79, 80, 84, 114, 116, 118) sowie DNS-Synthesehemmung (35, 38, 46, 54, 55, 83, 108) tre-

ten mit deutlicher Verzögerung auf, und auch bei einem in-vitro-Modell zur Untersuchung der nephrotoxischen Wirkung von Cisplatin wurde ein verzögerter Wirkungseintritt beschrieben (45).

Zur Erklärung des verzögerten Eintrittes des Cisplatin-Effekts bieten sich verschiedene Mechanismen an:

- Die Aufnahme des Cisplatin in die Zelle erfolgt mit Verzögerung.

Bereits Harder und Howle (46, 54, 55) hatten zwei verschiedene Membraneffekte als Mechanismen für eine verzögerte Aufnahme des Cisplatin in die Zelle in Erwägung gezogen:

1. eine geringe Penetrationsrate des hydrophilen Cisplatin durch die lipophilen Elemente der Zellmembran;
 2. eine zeitabhängige Interaktion des Cisplatin mit der Zellmembran, die eine veränderte Membranpermeabilität für Cisplatin und/oder seine Metabolite zur Folge hätte.
- Jedoch sprechen Ergebnisse an Cisplatin (70, 75) und dem analogen cis-Dichlordipyridinplatin II - ^3H (40) eindeutig dafür, daß Cisplatin durch passive Diffusion in die Zelle gelangt, wodurch eine Interaktion des Cisplatin mit Strukturen der Zellmembran unwahrscheinlich wird.

- Cisplatin wird in einem mit langsamer Kinetik ablaufenden Prozeß in einen oder mehrere aktive Metabolite umgewandelt. Bereits Harder und Howle (46, 55) postulierten zur Erklärung der mit Verzögerung auftretenden, im Vergleich zu RNS- und Proteinsynthese, bevorzugten DNS-Synthesehemmung eine zweistufige Umwandlung des Cisplatin in Metabolite mit verschiedenen großen Aktivitäten gegen DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese.

Chemische sowie pharmakologische Studien unterstützen diese Annahme. Eine u. U. langdauernde, enzymatische Umwandlung von Cisplatin in aktive Metabolite konnte ausgeschlossen werden (66). Bildung reaktiver Metabolite er-

folgt in wässriger Lösung durch nukleophile Substitution der Chlorid-Liganden des neutralen, wenig reaktiven Cisplatin mit H_2O - bzw. OH -Gruppen. Diese Reaktionen folgen dem Massenwirkungsgesetz, wobei das Gleichgewicht unter in-vivo-Bedingungen (pH, Chlorid-Konzentration) auf der Seite der Metaboliten liegt (56, 66, 92). Die sukzessive Substitution der Chlorid-Liganden durch H_2O -Gruppen läuft mit relativ langsamer Kinetik ab ($T_{1/2} = 6 - 8$ h bei $25^{\circ}C$). Die Bildung geladener, reaktiver Cisplatin-Verbindungen erfolgt dann nahezu sofort ($T_{1/2} =$ Millisekunden) (66).

- Die für die zytotoxische Wirkung des Cisplatin verantwortliche Reaktion, die Bildung der DNS-Doppelstrangvernetzungen läuft mit langsamer Kinetik ab. Bei der Analyse der Reaktionen von Cisplatin mit der zellulären DNS zeigte sich, daß das Ausmaß der DNS- Doppelstrangvernetzungen nur langsam anstieg und erst 6 bis 12 h nach Behandlungsbeginn sein Maximum erreichte (32, 34, 79, 80, 84, 114, 116, 118). Als Erklärung für die verzögerte Bildung von DNS-Doppelstrangvernetzungen wird ein Zweistufenmechanismus vorgeschlagen. Rasche Bindung eines reaktiven Cisplatin-Metaboliten führt zu lokaler Denaturierung und Distorsion der DNS-Doppelhelix. Das Freiwerden von Bindungsstellen auf dem komplementären Strang ermöglicht dann die mit langsamer Kinetik ablaufende Vernetzung der beiden DNS-Stränge in dem betroffenen DNS-Abschnitt (56, 65, 79, 114).

Der Reaktionsmechanismus des Cisplatin würde sich somit sogar als Vierstufenmechanismus darstellen, wobei in einem Zweistufenmechanismus mit einem limitierenden langsamen Schritt reaktive Cisplatin-Metabolite entstehen, welche dann wiederum in einem Zweistufenmechanismus, ebenfalls mit einem limitierenden, langsamen Schritt, die DNS-Doppelstrangvernetzungen bewirken.

4.2.3 Langzeitwirkung des Cisplatin in der Zellkultur

Während in der Literatur vornehmlich Untersuchungen zur Wirkung einer kurzzeitigen Behandlung von Zellen *in vitro* zu finden sind, wurde, um den *in-vivo*-Bedingungen möglichst gut zu entsprechen, das Wachstumsverhalten von Zellen unter langdauernder Cisplatin-Behandlung beobachtet. Dieses Vorgehen erschien sinnvoll, da:

- an einem *in-vivo*-*in-vitro*-Modell muriner Blasen Tumore gezeigt worden war, daß *in vitro* nur Inkubationszeiten mit Cisplatin über mehr als 24 h Ergebnisse liefern konnten, die den *in-vivo*-Effekten entsprachen (74).
- Cisplatin nur sehr langsam aus dem Körper entfernt wird, so daß selbst mehrere Wochen nach Beendigung einer Cisplatin-Therapie noch signifikante Platin-Spiegel im Plasma gefunden werden (48, 67, 68).

Die Anwendung von Verdünnungswachstumskurven ermöglichte die langdauernde Beobachtung der behandelten Zellen unter idealen Wachstumsbedingungen. Aus den Ergebnissen an REH- und auch an L-Zellen ist zu erkennen, daß bei kleineren und mittleren Cisplatin-Konzentrationen die induzierte Wachstums- hemmung lediglich eine vorübergehende Hemmung war, dann jedoch erneut Zellteilung - teilweise sogar regelrecht - stattfinden konnte. Auch Beobachtungen *in vivo* weisen auf einen solchen, vorübergehenden, wachstumshemmenden Effekt von Cisplatin hin (110).

Da eine Zunahme der Prozentualen Wachstumsinhibition als Funktion der Inkubationszeit bei konstanter Cisplatin-Konzentration nicht beobachtet werden konnte, kann, im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (5, 25, 26, 74, 85), bei kleinen Cisplatin-Konzentrationen und langen Inkubationszeiten eine direkte Abhängigkeit der Cisplatin-Wirkung von der Integraldosis, einer Größe, in die die Konzentration und die Behandlungsdauer eingehen, mit großer

Sicherheit ausgeschlossen werden.

Auch gibt der Verlauf der Wachstumskurven, bei welchen die Zellen teilweise bis in die zehnte Tochtergeneration verfolgt wurden eindeutigen Hinweis dafür, daß durch Cisplatin kein "proliferativer Zelltod" in nennenswertem Umfang bewirkt wird, d. h. daß Zellen späterer Generationen nicht an Cisplatin-induzierten, ererbten Schädigungen zugrunde gehen. Aus den Kurvenverläufen wurde vielmehr deutlich, daß die Zellpopulationen imstande waren, bei kleinen Cisplatin-Konzentrationen die Cisplatin-induzierte Schädigung zu kompensieren. Für dieses Phänomen sind verschiedene Erklärungen möglich:

- Kleine Cisplatin-Konzentrationen können lediglich die Dauer einzelner Zellzyklusphasen - und damit auch der gesamten Zellzykluszeit - verlängern, nicht jedoch die Progression der Zellen durch den Zellzyklus endgültig verhindern oder Zelluntergang in nennenswertem Ausmaß hervorrufen. Nachdem alle Zellen diese verlängerte(n) Zellzyklusphase(n) durchlaufen haben, kann die Zellpopulation wieder ungehindert proliferieren. Für eine derartige Annahme sprechen neben den Ergebnissen von Bergerat et al. auch die der vorliegenden flußzytometrischen Untersuchungen.
- Die Zellen könnten Reparaturmechanismen besitzen, welche für den passageren Charakter der Cisplatin-Effekte, sowohl der Wachstumshemmung als auch der Hemmung der Progression der Zellen im Zellzyklus, verantwortlich zu machen wären. Die Existenz solcher Reparaturmechanismen wurde bereits im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen gefordert (32, 34, 38, 39, 78, 79, 80, 84, 114, 115, 116).

Die Langzeitwirkung höherer Cisplatin-Konzentrationen ist dadurch charakterisiert, daß die Zellzahlen mit einer Latenz kontinuierlich abnehmen. Dieser Kurvenverlauf kommt wahrscheinlich durch das Stattfinden von Zelluntergang zustande. Eine Kompensation der Schädigung scheint bei den höheren Cisplatin-Konzentrationen nicht mehr möglich zu sein, jedoch

kann auch bei diesen Konzentrationen aufgrund des glatten Kurvenverlaufs ein bedeutender Cisplatin-Effekt, der sich in späteren Zellgenerationen manifestieren sollte, mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden.

4.3 Cisplatin-induzierte Veränderungen der Verteilung der Zellen im Zellzyklus

4.3.1 Veränderungen innerhalb des ersten Zellzyklus

Bereits der Verlauf der Wachstumskurven (keine Plateaubildung, keine sprunghafte Verlaufsänderung) hatte die Vermutung nahegelegt, daß Cisplatin mehr als einen Angriffspunkt im Zellzyklus besitzt. Diese Überlegung konnte durch die vorliegenden, flußzytometrischen Untersuchungen bestätigt werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Bergerat et al. (6) konnten auch an L-Zellen ineinandergreifende, konzentrationsabhängige Verzögerungen, bei höheren Cisplatin-Konzentrationen auch bleibende Blockierungen, der Zellen in allen Zellzyklusphasen aufgezeigt werden. Auch bei L-Zellen waren die in der Literatur an anderen Zelllinien beschriebenen Blockierungen der Zellen in der S- sowie in der (G_2 +M)-Phase besonders deutlich (61, 110, 113). Jedoch konnte durch Anwendung der Colcemid-Methode, die eine exakte Bestimmung des G_1 -Phasenanteils ermöglicht, gezeigt werden, daß auch bei kleinen Cisplatin-Konzentrationen alle Zellzyklusphasen von den Cisplatin-Effekten betroffen werden. Es ergab sich keinerlei Anhalt für eine Phasenspezifität oder Phasenpräferenz der Cisplatin-Wirkung.

Mit Hilfe der Colcemid-Methode konnte aufgezeigt werden, daß die Form der DNS-Histogramme zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Behandlungsbeginn das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels von Ausbildung und Auflösung von Blockierungen der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen darstellt. Da in den parallel zu den DNS-Histogrammen erstellten Wachstums-

kurven kein nennenswerter Zelluntergang zu verzeichnen war, kann als gesichert gelten, daß die zu beobachtenden Verteilungsveränderungen durch gehemmte Progression der Zellen im Zellzyklus zustandekommen, und nicht durch selektiven Zelluntergang in den verschiedenen Kompartimenten bedingt war. Ein derartiger, theoretisch denkbarer Wirkungsmechanismus konnte in den bisher veröffentlichten Untersuchungen (6, 60, 61, 95, 110, 113) nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da DNS-Histogramme nur relative Veränderungen innerhalb einer Zellpopulation aufzeigen.

Während bei kleinen Cisplatin-Konzentrationen keine persistierenden Effekte auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus beobachtet werden konnten, traten mit zunehmender Cisplatin-Konzentration bleibende Blockierungen der Zellen in der S- und der (G_2 +M)-Phase und schließlich auch in der G_1 -Phase auf. Diese Effekte können sich zum einen daraus erklären, daß nur bei kleinen Cisplatin-Konzentrationen die zellulären Reparaturmechanismen effektiv arbeiten können. Zum anderen kann auch der Wirkungsmechanismus des Cisplatin selbst für die beobachteten Effekte verantwortlich gemacht werden (s. 1.2.2 und 1.3.2) : Bildung von DNS-Vernetzungen, die eine Hemmung der DNS-Synthese bewirken, hätten zur Folge, daß die Zellen die DNS-Synthese nicht vollenden und in das (G_2 +M)-Kompartiment übertreten können und sich in der S-Phase anhäufen. Bei mit steigenden Cisplatin-Konzentrationen zunehmendem Ausmaß von DNS-Vernetzungen könnte auch der Startpunkt der Replikation häufiger betroffen sein, wodurch der Eintritt der Zellen in die S-Phase verhindert würde. Bei noch höheren Cisplatin-Konzentrationen tritt neben den DNS-Vernetzungen eine zusätzliche Störung der Transkription und der Proteinbiosynthese auf. Dadurch könnten enzymatische und synthetische Leistungen der Zelle in einem solchen Ausmaß behindert werden, daß sich daraus eine Blockierung der Zellen in allen Zellzyklusphasen ergeben könnten.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, den Zusammenhang zwischen der Cisplatin-induzierten Wachstumshemmung und der Hemmung der Zellen im Zellzyklus unter Cisplatin aufzuzeigen. Dieser Zusammenhang ergibt sich aus der Übereinstimmung der verschiedenen Cisplatin-Effekte hinsichtlich ihrer Kinetik (I) und ihres Ausmaßes (II).

ad I : Sowohl die Hemmung des Zellwachstums als auch die Veränderung der Verteilung der Zellen im Zellzyklus setzte mit einigen Stunden Latenz ein. Daß die Abflachung der Wachstumskurven erst ca. zwei Stunden nach der Ausbildung erster Veränderungen der DNS-Histogramme auftrat, erklärt sich daraus, daß eine Hemmung der Progression der Zellen im Zellzyklus sich bereits ausgebildet haben muß, bevor sie sich als meßbare Wachstumshemmung manifestieren kann.

ad II: Das Ausmaß Cisplatin-induzierter Wachstumshemmung, gemessen mit Wachstumskurven, entsprach dem Ausmaß der Cisplatin-induzierten Hemmung im Zellzyklus, ermittelt aus den (G_2+M) -Influx-Kurven. Da Zellverlust in nennenswertem Umfang nicht stattfand, wurde der Verlauf der (G_2+M) -Influx-Kurven bestimmt vom Ausmaß der Blockierungen in der G_1 - und S-Phase. Diese können somit mit großer Sicherheit für die beobachtete Wachstumshemmung verantwortlich gemacht werden.

Daß es bisher nicht gelungen war, die Beziehung zwischen den Effekten von Cisplatin auf die Progression der Zellen im Zellzyklus und denjenigen auf das Wachstumsverhalten dieser Zellen aufzuzeigen (6), ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß ein Vergleich von Ergebnissen aus Koloniebildungstests, die reproduktives Wachstum von Tochtergenerationen geschädigter Zellen messen, mit Ergebnissen aus flußzytometrischen Untersuchungen, in welchen die kinetischen Effekte auf die Zelle selbst gemessen werden, nicht sinnvoll ist.

4.3.2 Veränderungen unter mehrwöchiger Cisplatin-Behandlung

Bei der Langzeitbeobachtung von L-Zellen unter kontinuierlicher Cisplatin-Einwirkung ergaben sich keine eindeutigen Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Hemmung im Zellzyklus unter Cisplatin und der Hemmung des Zellwachstums.

Im Widerspruch zu den Beobachtungen von Bergerat et al. (6) an Zellen einer menschlichen Kolonkarzinomzelllinie zeigte sich an L-Zellen, trotz kontinuierlicher Cisplatin-Behandlung, Um- und Rückbildung der Cisplatin-bedingten Veränderungen der Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Wie zwischenzeitlich auch an anderen Zelllinien beschrieben (61, 110, 113) sammelten sich L-Zellen nach der Auflösung des S-Phase-Blocks im 4C-Kompartiment. Dann aber scheint nur ein Teil der Zellen durch reguläre Zellteilung ins 2C-Kompartiment gelangen zu können. Ein anderer Teil tritt in eine höhere Ploidiestufe ein, wie es auch Bergerat et al. (6) beschrieben hatten. Diese Zellen werden dann anscheinend in der zweiten S-Phase, in welcher sie einen DNS-Gehalt zwischen 4C und 8C besitzen, blockiert, so daß nur ein geringer Prozentsatz das 8C-Kompartiment erreichen konnte. Die beobachtete, Cisplatin-induzierte Ansammlung von Zellen im 4C-Kompartiment wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als synchronisierende Wirkung von Cisplatin interpretiert. Eine reguläre Teilung dieser Zellen in normale Zellen mit einem DNS-Gehalt von 2C wurde jedoch nicht nachgewiesen (61, 113). Unter Berücksichtigung des Wachstums zu höherer Ploidie wird es wahrscheinlich, daß nur ein Teil der Zellen im 4C-Kompartiment tatsächlich (G_2+M)-Zellen waren, ein anderer Teil jedoch hyperploide G_1 -Zellen. Dadurch wird eine echte synchronisierende Wirkung in Frage gestellt.

Neben den DNS-Histogrammen sprach auch das mikroskopische Bild der Zellen für ein Wachstum zu höherer Ploidie. Nach einigen Tagen Behandlungsdauer gab es in den Zellpopulationen eine Anzahl von Zellen, die sich durch enorme Kern- und Zell-

größe von den normalen, nicht behandelten Zellen unterschieden. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits an verschiedenen Zelllinien gemacht (47, 54, 76, 91, 95, 98). Selbst bei Cisplatin-Konzentrationen, die nicht unbedingt zytotoxisch sein müssen, zeigen behandelte Zellen gigantische Zellformen. Die Zellen können in ein Vielkernestadium übergehen, aus welchem jedoch durch Zellteilung wieder normale Zellen entstehen können (47, 91).

Im Zusammenhang mit den morphologischen Veränderungen unter Cisplatin-Einwirkung sei erwähnt, daß L-Zellen, die längere Zeit mit Cisplatin-Dosen höher als 1 mg/l behandelt wurden, sehr viel fester am Flaschenboden hafteten als unbehandelte Zellen und nach dem Trypsiniervorgang nur durch relativ kräftiges Abspritzen abzulösen waren. Ähnliches Verhalten wurde auch nach Behandlung der Zellen mit Methotrexat beobachtet (14). Ursache für dieses Verhalten können Cisplatin-induzierte Veränderungen der Zelloberfläche sein, wie sie in elektronenmikroskopischen Untersuchungen beschrieben sind. Nach Cisplatin-Behandlung wurde die Ausbildung pseudopodien-ähnlicher Ausstülpungen des Zytoplasmas (1) bzw. die von Mikrovilli auf der Zelloberfläche und im Interzellularspalt (95) beobachtet. Derartige Veränderungen könnten bei gleichzeitiger Vergrößerung der Zelloberfläche zu einer gesteigerten Zelladhärenz führen.

4.4 Erholungsfähigkeit Cisplatin-geschädigter Zellen

An verschiedenen Zelllinien wurde beschrieben, daß Zellen nicht imstande sind, sich von einer subletalen Schädigung durch Cisplatin zu erholen (5, 26). Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen konnte aufgewiesen werden, daß L- und REH-Zellen die Fähigkeit besitzen, Cisplatin-induzierte Schädigungen zu kompensieren. Sowohl die Hemmung im Zellzyklus als auch die Wachstums hemmung konnte überwunden werden, wenn den Zellen ausreichend behandlungsfreie Zeit gelassen wurde. Die Dauer

des Cisplatin-freien Intervalls, das zur Erholung benötigt wurde, war abhängig von der Dosis und der Behandlungsdauer. Nach Ablauf dieser Zeit zeigten die Zellen wieder die Fähigkeit zu exponentiellem Wachstum. Bei REH-Zellen entsprach die Proliferationsgeschwindigkeit dann wieder derjenigen unbehandelter Kontrollzellen. Da die Steigungen der Wachstumskurven über Wochen hinweg konstant blieben, kann auch eine Manifestation von Cisplatin Effekten in noch späteren Zellgenerationen mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden. Behandelte L-Zellen konnten nach dem Wiedereintreten in eine exponentielle Wachstumsphase die Populationsverdopplungszeiten unbehandelter Kontrollzellen nicht erreichen. Diese verlängerte Populationsverdopplungszeit kann entweder Ausdruck einer überwiegenden Verminderung der Proliferationsgeschwindigkeit oder eines Überwiegens des Zellverlustes sein.

Neben der prinzipiellen Fähigkeit von L-Zellen, sich von Cisplatin-Schäden zu erholen, konnte gezeigt werden, daß nach dem Wiedereinsetzen des Zellwachstums das Proliferationsvermögen der Zellen mit zunehmender Erholungszeit ansteigt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Ergebnissen von Fraval und Roberts (38): An Chinesischen Hamsterzellen wurde gezeigt, daß mit zunehmender Zeit nach der Behandlung stationärer Zellen deren Fähigkeit, zu überleben und in Nähragar Kolonien zu bilden, größer wird. Es wurde ein direkter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Koloniebildung und der an zelluläre DNS gebundenen Cisplatin-Menge aufgedeckt, die mit zunehmender Zeit nach Behandlungsende durch die Aktivität eines Excision-Repair-Mechanismus abnimmt. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß sich die an L- und REH- Zellen beobachteten Erholungseffekte ebenfalls durch die Aktivierung eines Reparaturmechanismus erklären. Ein solcher wurde auch im Zusammenhang mit anderen Cisplatin-Effekten gefordert (32, 34, 38, 39, 78, 79, 80, 84, 114, 115, 117).

4.5 Wirkung des Cisplatin auf die Kinetik des Übergangs ruhender Zellen ins proliferative Stadium

Da in den meisten Tumoren ein nicht zu vernachlässigender Anteil aus ruhenden, nicht proliferierenden Zellen besteht, die unter entsprechenden Bedingungen wieder in den proliferativen Zellpool zurückkehren können, ist die Frage nach der Wirksamkeit eines Zytostatikums gegen ruhende Zellen von hoher therapeutischer Relevanz.

Die Anwendung der BrdU-Methode gestattete erstmals die direkte Beobachtung der Effekte von Cisplatin auf das Teilungsverhalten wachstumsstimulierter, vormals ruhender Zellen. Bei Behandlung der Zellen vor und nach der Wachstumsstimulierung trat eine deutlich meßbare Verzögerung der Teilungskinetik der Zellen auf. Ihr Ausmaß war abhängig von der Cisplatin-Konzentration und von der Behandlungsdauer. Selbst bei kleinen Cisplatin-Konzentrationen, die in exponentiell wachsenden Zellpopulationen unterhalb einer wirksamen Schwellenkonzentration lagen, waren eindeutige Verzögerungseffekte zu verzeichnen. Zum einen könnte sich diese Beobachtung durch eine erhöhte Empfindlichkeit nicht proliferierender Zellen gegen Cisplatin erklären: In Untersuchungen zur phasenspezifischen Wirkung von Cisplatin wurde bereits eine gesteigerte Empfindlichkeit nicht proliferierender Zellen gegen Cisplatin beschrieben (5, 30, 39). Auch in vivo weisen langsam regenerierende Gewebe mit einem großen Anteil nicht proliferierender Zellen eine erhöhte Anfälligkeit gegen Cisplatin auf (41, 45, 50, 73, 77, 93). Zum anderen könnten durch die BrdU-Methode wegen ihrer großen Empfindlichkeit Effekte aufgedeckt werden, die in Wachstumskurven nicht erfaßt werden können.

Auf der anderen Seite wurde aus den Untersuchungen deutlich, daß selbst relativ hohe Cisplatin-Konzentrationen, die in exponentiell wachsenden Zellpopulationen zu einer Stagnation der Zellzahlen führten, nicht den Übergang aller Zellen vom ruhenden ins proliferative Stadium verhindern konnten.

Aus der mit zunehmender Cisplatin-Konzentration zunehmenden Verschiebung der Teilungskurven zu späteren Zeiten ergibt sich die Abhängigkeit der Teilungskinetik von der Cisplatin-Konzentration. Die parallele Verschiebung der Teilungskurven kommt dadurch zustande, daß mit steigender Cisplatin-Konzentration der Zeitraum verlängert wird, in dem die ersten Zellen die Mitose vollenden können. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Zellen nur eine vorübergehende Blockierung an einer oder mehreren Stellen im Zellzyklus erfahren, dann aber, nach Auflösung der Blocks, den restlichen Zellzyklus unbehindert vollenden können. Erst bei höheren Cisplatin-Konzentrationen kommt zu der Parallelverschiebung eine Abflachung der Teilungskurven. Diese entsteht dadurch, daß pro Zeiteinheit nur noch weniger Zellen die Zellteilung vollenden können als in den unbehandelten Kontrollpopulationen. Als Ursache dafür kommt eine nicht überwindbare Hemmung im Zellzyklus oder auch das Auftreten von Zelluntergang bei höheren Cisplatin-Konzentrationen in Betracht.

Neben der Abhängigkeit der Teilungsverzögerung von der Cisplatin-Dosis bestand eine solche auch von der Behandlungsdauer. Mit zunehmender Behandlungsdauer erfolgte eine Parallelverschiebung der Teilungskurven zu späteren Zeiten. Bereits nach 16-stündiger Inkubation der Zellen wurde eine Teilungsverzögerung in demselben Ausmaß bewirkt wie durch eine Dauerbehandlung mit derselben Cisplatin-Konzentration.

DNS-Histogramme stimulierter Zellpopulationen nach Anwendung der BrdU-Methode gestatten Aussagen über die Angriffspunkte des Cisplatin im Zellzyklus dieser speziellen Zellgruppe. Aus den DNS-Histogrammen zu verschiedenen Zeiten nach Wachstumsstimulierung wird deutlich, daß die Verzögerung der Teilungskinetik durch Cisplatin nicht am Übergang der Zellen vom ruhenden ins proliferative Stadium stattfindet. Die Zellen wurden nicht im 2C-Kompartiment festgehalten. Vielmehr konnten alle Zellen in den Zellzyklus eintreten, wo sie sich

dann, wie die exponentiell wachsenden Zellen, in der S-Phase sammeln, um langsam in die (G_2+M)-Phase weiterzuwandern und sich schließlich ohne Ausbildung einer Synchronwelle zu teilen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde versucht, einige therapierelevante Cisplatin-Effekte auf das zellkinetische Verhalten von L- und REH-Zellen zu charakterisieren.

Ausmaß und Kinetik der Cisplatin-induzierten Wachstumshemmung wurde mit Hilfe von Wachstumskurven bestimmt. Die ermittelten Dosis-Effekt-Kurven zeigten oberhalb einer Schwellenkonzentration eine direkte Abhängigkeit der Wachstumsinhibition von der Cisplatin-Konzentration im Nährmedium, bis bei ca. 1 mg/l ein Wirkplateau erreicht wurde. Erst Konzentrationen von mehr als 10 mg/l führten zu einer erneuten Zunahme der Wachstumshemmung. Die Kinetik der Cisplatin-induzierten Wachstumshemmung war durch eine Latenzzeit von ca. 6 h charakterisiert, nach welcher eine konzentrationsabhängige Hemmung des Zellwachstums einsetzte. In Langzeitbeobachtungen von L-Zellen und mit Hilfe von Verdünnungswachstumskurven, die eine Beobachtung von REH-Zellen unter idealen Wachstumsbedingungen garantierten, wurde der vorübergehende Charakter der Cisplatin-induzierten Wachstumshemmung bei kleineren und mittleren Cisplatin-Konzentrationen sowie das Fehlen von "proliferativem Zelltod" in Tochtergenerationen geschädigter Zellen aufgezeigt.

Mit Hilfe flußzytometrischer Methoden wurden an L-Zellen komplexe, konzentrationsabhängige Verzögerungen, bei höheren Cisplatin-Konzentrationen auch Blockierungen, der Progression der Zellen in allen Zellzyklusphasen aufgedeckt, wobei bis zu therapeutisch erreichbaren Konzentrationen Anhäufungen von Zellen in der S- und der (G_2+M)-Phase im Vordergrund standen. Nach langer Behandlungsdauer konnte Um- und Rückbildung dieser Verteilungsveränderungen sowie Wachstum zu höherer Ploidie beobachtet werden. Es ist gelungen, innerhalb der ersten Teilungsrunde nach Behandlungsbeginn, eindeutige Zusammenhänge zwischen der Cisplatin-induzierten Hemmung des Zellwachstums

und der Hemmung im Zellzyklus unter Cisplatin aufzuzeigen.

An beiden Zelllinien konnte dargestellt werden, daß die Zellen imstande sind, sich von einer Cisplatin-bedingten Schädigung zu erholen. Die Dauer des für die Erholung benötigten, behandlungsfreien Intervalls war abhängig von der Behandlungsdosis und der Behandlungsdauer. Mit zunehmender Zeit nach Behandlungsende stieg das Proliferationsvermögen der behandelten Zellen.

Mit Hilfe der BrdU-Methode wurden die Cisplatin-Effekte auf das Teilungsverhalten wachstumsstimulierter L-Zellen aufgezeigt. Cisplatin bewirkte eine Verzögerung der Teilungskinetik, deren Ausmaß von der Cisplatin-Konzentration im Nährmedium und der Behandlungsdauer abhing. Auch durch höhere Cisplatin-Dosen konnte jedoch der Übergang ruhender Zellen ins proliferative Stadium nicht verhindert werden. Die Verzögerung der Teilungskinetik kam durch Verzögerungen und Blockierungen der Zellen vornehmlich in der S- und (G_2 +M)-Phase zustande.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ambrose K. R., Lowrey J.S.:
Effect of cis- and trans-Dichlorodiammineplatinum(II) on
Human Tumor Cell Proliferation in Diffusion Chambers
in vivo
Cancer Res. 42, 1769 ff. (1982)
2. Barlogie B., Drewinko B., Corry P. M.:
In Vitro Thermochemotherapy of Human Colon Cancer (LoVo)
Cells with cis-Dichlorodiammineplatinum II (DDP) and
Mitomycin C (M)
Proc. of the Am. Assoc. Cancer Res. and ASCO 20, 58 f.
(1979)
3. Belt R.J., Himmelstein K. J., Patton T. F., Bannister S. J.,
Sternson L. A., Repta A. J.:
Pharmacokinetics of Non-Protein-Bound Platinum Species
- Following Administration of cis-Dichlorodiammineplatinum(II)
Cancer Treat. Rep. 63, 1515 ff. (1979)
4. Bergerat J.-P., Green C., Drewinko B.:
Combination Chemotherapy in vitro. IV. Response of Human
Colon Carcinoma Cells to Combinations Using cis-
Diamminedichloroplatinum
Cancer Biochem. Biophys. 3, 173 ff. (1979)
5. Bergerat J.-P., Barlogie B., Drewinko B.:
Effect of cis-Dichlorodiammineplatinum(II) on Human
Colon Carcinoma Cells in vitro
Cancer Res. 39, 1334 ff. (1979)
6. Bergerat J.-P., Barlogie B., Göhde W., Johnston D. A.,
Drewinko B.:
In vitro Cytokinetic Response of Human Colon Cancer Cells
to cis-Dichlorodiammineplatinum(II)
Cancer Res. 39, 4356 ff. (1979)

7. Bergerat J.-P., Drewinko B., Corry P., Barlogie B., Ho D.H.:
Synergistic Lethal Effect of cis-Dichlorodiammineplatinum
and 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine
Cancer Res. 41, 25 ff. (1981)
8. Böhmer R.-M.:
Entwicklung neuer flußzytometrischer Meßverfahren und ihr
Einsatz zur Untersuchung der Proliferationskinetik bei
Säugetierzellen in Kultur
Promotionsarbeit, Universität Hamburg (1978)
9. Böhmer R.-M.:
Flow Cytometric Cell Cycle Analysis Using the Quenching
of 33258 Höchst Fluorescence by Bromodeoxyuridine
Incorporation
Cell Tissue Kinet. 12, 101 ff. (1979)
10. Böhmer R.-M.:
Determination of Non-Proliferating Cells in Culture by
- Combining Flow Cytometry with Stathmokinetics
Cell Tissue Kinet. 13, 497 ff. (1980)
11. Böhmer R.-M., Ellwart J.:
Cell Cycle Analysis by Combining the 5-Bromodeoxyuridine/
33258 Höchst Technique with DNA-Specific Ethidium Bromide
Staining
Cytometry 2, 31 ff. (1981)
12. Böhmer R.-M., Ellwart J.:
Combination of BrdU-quenched Höchst Fluorescence with
DNA-Specific Ethidium Bromide Fluorescence for Cell
Cycle Analysis with a Two-parametrical Flow Cytometer
Cell Tissue Kinet. 14, 653 ff. (1981)
13. Böhmer R.-M.:
Flow Cytometry and Cell Proliferation Kinetics
Process in Histochem. and Cytochem. Vol. 14, No. 4 (1982)
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

14. Böhmer R.-M.:
Unveröffentlichte Beobachtung
15. Borch R. F., Katz J. C., Lieder P. H., Pleasants M. E.:
Effects of Diethyldithiocarbamate Rescue on Tumor
Response to cis-Platinum in a Rat Model
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5441 ff. (1980)
16. Burchenal J. H., Kalaher K., O'Toole T., Chisholm J.:
Lack of Cross-resistance between Certain Platinum
Coordination Compounds in Mouse Leukemia
Cancer Res. 37, 3455 ff. (1977)
17. Calabresi P., Parks R. E.:
Chemotherapy of Neoplastic Diseases
in: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of
Therapeutics, 6th Edition, Macmillan Publishing Co.,
Inc., New York, 1249 ff.
18. Calabresi P., Parks R. E.:
s.o. 1298 ff.
19. Chang B. K., Black O., Jr., Gutman R.:
Inhibition of Growth of Human or Hamster Pancreatic
Cancer Cell Lines by α -Difluoromethylornithine Alone
and Combined with cis-Diamminedichloroplatinum(II)
Cancer Res. 44, 5100 ff. (1984)
20. Cisplatin (no author)
The Lancet, Feb. 13, 1982, 374 ff. (1982)
21. Connors T. A.:
Anti-Tumor Effects of Platinum Complexes in Experimental
Animals
in: Platinum Complexes in Cancer Chemotherapy, ed. by
T. A. Connors and J. J. Roberts, Springer Verlag
Berlin - Heidelberg - New York, 113 ff. (1974)
22. Cottier:
Pathogenese Band 1
Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York, 136 ff.
(1980)

23. De Conti R. C., Toftness B. R., Lange R. C., Creasey W. A.:
Clinical and Pharmacological Studies with cis- Diammine-
dichloroplatinum(II)
Cancer Res. 33, 1310 ff. (1973)
24. Deutsch W. A., Spiering A. L., Newkome G. R.:
An in vitro Characterization of Interstrand Cross-Links
in DNA Exposed to the Antitumor Drug cis-Dichloro-
diammineplatinum(II)
Biochem. and Biophys. Res. Commun. 97, 1220 ff. (1980)
25. Drewinko B., Brown B. W., Gottlieb J. A.:
The Effect of cis-Diamminedichloroplatinum(II) on
Cultured Human Lymphoma Cells and Its Therapeutic
Implications
Cancer Res. 33, 3091 ff. (1973)
26. Drewinko B., Gottlieb J. A.:
Action of cis-Dichlorodiammineplatinum(II)(NSC-119875)
- at the Cellular Level
Cancer Chemother. Rep. 59, 665 ff. (1975)
27. Drewinko B., Green C., Loo T. L.:
Combination Chemotherapy in vitro with cis-Dichloro-
diammineplatinum(II)
Cancer Treat. Rep. 60, 1619 ff. (1976)
28. Drewinko B., Loo T. L., Brown B., Gottlieb J. A.,
Freireich E. J.:
Combination Chemotherapy in vitro with Adriamycin.
Observations of Additive, Antagonistic, and Synergistic
Effekts When Used in Two-drug Combinations on Cultured
Human Lymphoma Cells
Cancer Biochem. Biophys. 1, 187 ff. (1976)
29. Drewinko B., Roper P. R., Barlogie B.:
Patterns of Cell Survival Following Treatment With
Antitumor Agents in vitro
Eur. J. Cancer 15, 93 ff. (1979)

30. Drewinko B., Barlogie B., Anderson M. D.:
Differences in the Killing Efficacy of Antitumor Drugs
on Proliferating (P) and Nonproliferating (NP) Human
Cells
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. and ASCO 21, 285 f. (1980)
31. Drewinko B., Patchen M., Yang L.-Y., Barlogie B.:
Differential Killing Efficacy of Twenty Antitumor Drugs
on Proliferating and Nonproliferating Human Tumor Cells
Cancer Res. 41, 2328 ff. (1981)
32. Ducore J. M., Erickson L. C., Zwelling L. A., Laurent G.,
Kohn K. W.:
Comparative Studies of DNA Cross-Linking and Cytotoxicity
in Burkitt's Lymphoma Cell Lines Treated with cis-
Diamminedichloroplatinum(II) and L-Phenylalanine Mustard
Cancer Res. 42, 897 ff. (1982)
33. Eastman A., Bresnick E.:
- Studies on the Resistance of a Murine Leukemia L 1210
Cell Line to cis-Diamminedichloroplatinum(II)
Biochem. Pharmacol. 30, 2721 ff. (1981)
34. Erickson L. C., Zwelling L. A., Ducore J. M., Sharkey N. A.,
Kohn K. W.:
Differential Cytotoxicity and DNA Cross-Linking in
Normal and Transformed Human Fibroblasts Treated with
cis-Diamminedichloroplatinum(II)
Cancer Res. 41, 2791 ff. (1981)
35. Fishman P., Levi J., Notti I., Djaldetti M.:
Synthesizing Activity and Ultrastructural Findings of
Human Blood Cells after Incubation with cis-Platinum
"in vitro"
Biomedicine 34, 78 ff. (1981)
36. Forth W., Henschler D., Rummel W.:
Pharmakologie und Toxikologie
Bibliographisches Institut, Mannheim - Wien - Zürich,
565 ff. (1980)

37. Forth W., Henschler D., Rummel W.:
s. o. 569 ff. (1980)
38. Fraval H. N. A., Roberts J. J.:
Excision Repair of cis-Diamminedichloroplatinum(II)-
induced Damage to DNA of Chinese Hamster Cells
Cancer Res. 39, 1793 ff. (1979)
39. Fraval H. N. A., Roberts J. J.:
G₁ Phase Chinese Hamster V79-379A Cells Are Inherently
More Sensitive to Platinum Bound to Their DNA than
Mid S Phase or Asynchronously Treated Cells
Biochem. Pharmacol. 28, 1575 ff. (1979)
40. Gale G. R., Morris C. R., Atkins L. M., Smith A. B.:
Binding of an Antitumor Platinum Compound to Cells as
Influenced by Physical Factors and Pharmacologically
Active Agents
Cancer Res. 33, 813 ff. (1973)
41. Gale G. R.:
Platinum Compounds
in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Hefter-
Heubner New Series, XXXVIII/II Antineoplastic and
Immunosuppressive Agents, Part II,
Editors: Sartorelli A. C., Johns D. G.,
Springer Verlag, 829 ff. (1975)
42. Göhde W., Dittrich W.:
Impulsfluorometrie - ein neuartiges Durchflußverfahren
zur ultraschnellen Mengenbestimmung von Zellinhalts-
stoffen
Acta Histochem. 10, 429 ff. (1971)
43. Grdina D. J., Peters L. J., Jovonovich J. A.:
Cytotoxic Effect of Selected Chemotherapeutic Agents
in vivo on Synchronized Murine Fibrosarcoma Cells
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. and ASCO 20, 41 f. (1979)

44. Grdina D. J., Sigdestad C. P., Peters L.J.:
Cytotoxic Effects in vivo of Selected Chemotherapeutic Agents on Synchronized Murine Fibrosarcoma Cells
Br. J. Cancer 42, 677 ff. (1980)
45. Guarino A. M., Miller D. S., Arnold S. T., Pritchard J. B., Davis R. D., Urbanek M. A., Miller T. J., Litterst C. L.:
Platinat Toxicity: Past, Present, and Prospects
Cancer Treat. Rep. 63, 1475 ff. (1979)
46. Harder H.C., Rosenberg B.:
Inhibitory Effects of Anti-Tumor Platinum Compounds on DNA, RNA and Protein Synthesis in Mammalian Cells in vitro
Int. J. Cancer 6, 207 ff. (1970)
47. Harder H. C.:
Effects of Platinum Compounds on Bacteria, Viruses and Cells in Culture
in: Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy
ed. by T. A. Connors and J. J. Roberts, Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York 98 ff. (1974)
48. v. Heyden H. W., Henkel H., Nagel G. A., Weinstock N.:
Pharmakokinetik von Platin im Plasma und Urin des Menschen unter 1-, 8- und 24-Stunden-Infusionsdauer mit cis-Dichlorodiamino-Platin(II) (cis-DDP)
Klin. Wochenschr. 60, 247 ff. (1982)
49. Hill J. M., Loeb E., Mac Lean A. S., Hill N. O., Khan A., Kogler J.:
Further Clinical Experience with cis-Platinum II Diammine-dichloride
in: Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy
ed. by T. A. Connors and J. J. Roberts, Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York, 145 ff. (1974)

50. v. Hoff D. D., Schilsky R., Reichert C. M., Reddick R. L.,
Rozenzweig M., Young R. C., Muggia F. M.:
Toxic Effects of cis-Dichlorodiammineplatinum(II) in Man
Cancer Treat. Rep. 63, 1527 ff. (1979)
51. Holiat S. M., Smith W. E., Hubert D. D., Davis S.:
Chemotherapeutic Trials With Hamster Mesothelioma 10-24:
Responses to Azacitidine, Aziridinybenzoquinone,
Cisplatin, and PCNU
Cancer Treat. Rep. 65, 1113 ff. (1981)
52. Horáček P., Drobník J.:
Interaction of cis-Dichlorodiammineplatinum(II) With DNA
Biochim. Biophys. Acta 254, 341 ff. (1971)
53. Howell S. B., Taetle R.:
Effect of Sodium Thiosulfate on cis-Dichlorodiammine-
platinum(II) Toxicity and Antitumor Activity in L 1210
Leukemia
Cancer Treat. Rep. 64, 611 ff. (1980)
54. Howle J. A., Gale G. R.:
Cis-Dichlorodiammineplatinum(II): Persistent and Selective
Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in vivo
Biochem. Pharmacol. 19, 2757 ff. (1970)
55. Howle J. A., Thompson H. S., Stone A. E., Gale G. R.:
Cis-Dichlorodiammineplatinum(II): Inhibition of Nucleic
Acid Synthesis in Lymphocytes Stimulated With Phyto-
hemagglutinin (35675)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 800 ff. (1971)
56. Kelman A. D., Peresie H. J.:
Mode of DNA Binding of cis-Platinum(II) Antitumor Drugs:
A Base Sequence-Dependent Mechanism is Proposed
Cancer Treat. Rep. 63, 1445 ff. (1979)
57. Kleinermaier E. S., Muchmore A. V.:
Cis-Platinum (II) Diamminedichloride (PDD) Stimulates
Spontaneous Monocyte-mediated Cellular Cytotoxicity (SMCC)
Proc. Am. Assoc. of Cancer Res. and ASCO 20, 169 ff. (1979)

58. Kleineremann E. S., Zwelling L. A., Muchmore A. V.:
Enhancement of Naturally Occurring Human Spontaneous
Monocyte-mediated Cytotoxicity by cis-Diamminedichloro-
platinum(II)
Cancer Res. 40, 3099 ff. (1980)
59. Kociba R. J., Sleight S. D., Rosenberg B.:
Inhibition of Dunning Ascitic Leukemia and Walker 256
Carcinosarcoma With cis-Diamminedichloroplatinum
(NSC-119875)
Cancer Chemother. Rep. 54, 325 ff. (1970)
60. Köpf-Maier P., Wagner W., Liss E.:
Cytokinetic Behavior of Ehrlich Ascites Tumor After
in vivo Treatment with cis-Diamminedichloroplatinum(II)
and Metallocene Dichlorides
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 201, 21 ff. (1981)
61. Köpf-Maier P., Wagner W., Liss E.:
- Induction of Cell Arrest at G_1/S and in G_2 After Treatment
of Ehrlich Ascites Tumor Cells with Metallocene Dichlorides
and cis-Platinum in vitro
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 106, 44 ff. (1983)
62. Lagasse L. D., Pretorius R. G., Petrilli E. S., Ford L. C.,
Hoeschele J., Kean C.:
The Metabolism of cis-Dichlorodiammineplatinum(II):
Distribution, Clearance, and Toxicity
Am. J. Obstet. Gynecol. 139, 791 ff. (1981)
63. Langen P., Graetz H., Lehmann W.:
The Use of Cytosine Arabinoside and Colchicine in FCM
Analysis of Cell Cycle Effects of Inhibitors in an
Asynchronous Cell Culture
IVth Int. Symp. on Flow Cytometry, Voss 1979,
Proc. in Laerum O. D., Lindmo L., Thorud E. (eds.)
Flow Cytometry IV, Unverstetsforlaget, Bergen Oslo Tromso,
362 ff. (1979)

64. Latt S. A., George Y. S., Gray J. W.:
Flow Cytometric Analysis of Bromodeoxyuridine Substituted
Cells Stained With 33258 Höchst
J. Histochem. Cytochem. 25, 927 ff. (1981)
65. Laurent G., Erickson L. C., Sharkey N. A., Kohn K. W.:
DNA-Cross-Linking and Cytotoxicity Induced by
cis-Dichlorodiammineplatinum(II) in Human Normal and
Tumor Cell Lines
Cancer Res. 41, 3347 ff. (1981)
66. LeRoy A. F., Lutz R. J., Dedrick R. L., Litterst C. L.,
Guarino A. M.:
Pharmacokinetic Study of cis-Dichlorodiammineplatinum(II)
(DDP) in the Beagle Dog: Thermodynamic and Kinetic
Behavior of DDP in a Biologic Milieu
Cancer Treat. Rep. 63, 59 ff. (1979)
67. Litterst C. L., Gram T. E., Dedrick R. L., LeRoy A. F.,
Guarino A. M.:
Distribution and Disposition of Platinum Following
Intravenous Administration of cis-Diamminedichloro-
platinum(II) (NSC 119875) to Dogs
Cancer Res. 36, 2340 ff. (1976)
68. Litterst C. L., LeRoy A. F., Guarino A. M.:
Disposition and Distribution of Platinum Following
Parenteral Administration of cis-Dichlorodiammine-
platinum(II) to Animals
Cancer Treat. Rep. 63, 1485 ff. (1979)
69. Long D. F., Repta A. J.:
Cisplatin: Chemistry, Distribution and Biotransformation
Biopharmaceutics and Drug Disposition 2, 1 ff. (1981)
70. Long D. F., Patton T.F., Repta A. J.:
Platinum Levels in Human Erythrocytes Following Intra-
venous Administration of Cisplatin: Importance of
Erythrocytes as a Distribution Site for Platinum Species
Biopharmaceutics and Drug Disposition 2, 137 ff. (1981)

71. Melamed M. R., Mullaney P. F., Mendelson M. L.:
Flow Cytometry and Sorting
John Wiley & Sons, New York (1979)
72. Meyn R. E., Meistrich M. L., White R. A.:
Cycle-dependent Anticancer Drug Cytotoxicity in Mammalian
Cells Synchronized by Centrifugal Elutriation
J. Natl. Cancer Inst. 64, 1215 ff. (1980)
73. Muggia F. M., Rozencweig M., Penta J.:
Clinical Implications of Cisplatin Pharmacology
Rec. Results in Cancer Res. 74, 132 ff. (1980)
74. Niell H. B., Wood C. A., Mickey D. D., Soloway M. S.:
Time and Concentration-dependent Inhibition of the
Clonogenic Growth of N-(4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl)-
formamide-induced Murine Bladder Tumor Cell Lines by
cis-Diamminedichloroplatinum(II)
Cancer Res. 42, 807 ff. (1982)
75. Ogawa M., Gale G. R., Keirn S. S.:
Effects of cis-Diamminedichloroplatinum (NSC 119875)
on Murine and Human Hemopoietic Precursor Cells
Cancer Res. 35, 1398 ff. (1975)
76. Oosterhuis J. W., Andrews P. W., Knowels B. B., Damjanov I.:
Effects of cis-Platinum on Embryonal Carcinoma Cell
Lines in vitro
Int. J. Cancer 34, 133 ff. (1984)
77. Osieka R., Schmidt C. G.:
Cis-Diamino-Dichloro-Platin(II)
Klin. Wochenschr. 57, 1249 ff. (1979)
78. Pascoe J. M., Roberts J. J.:
Interactions Between Mammalian Cell DNA and Inorganic
Platinum Compounds - 1
Biochem. Pharmacol. 23, 1345 ff. (1974)

79. Pera M. F., Rawlings C. J., Shackleton J., Roberts J. J.:
Quantitative Aspects of the Formation and Loss of DNA
Interstrand Crosslinks in Chinese Hamster Cells Following
Treatment with cis-Diamminedichloroplatinum(II)
(Cisplatin)
II. Comparison of Results from Alkaline Elution, DNA
Renaturation and DNA Sedimentation Studies
Biochim. Biophys. Act. 655, 152 ff. (1981)
80. Flooy A. C. M., van Dijk M., Lohman P. H. M.:
Induction and Repair of DNA Cross-Links in Chinese
Hamster Ovary Cells Treated with Various Platinum
Coordination Compounds in Relation to Platinum Binding
to DNA, Cytotoxicity, Mutagenicity, and Antitumor
Activity
Cancer Res. 44, 2043 ff. (1984)
81. Possinger K., Hartenstein R., Misera C., Ehrhart H.:
Hemmung der ^3H -TdR-Aufnahme in Tumorzellen nach
Zytostatikagabe als Maß therapeutischer Wirksamkeit
Blut 43, 105 ff. (1981)
82. Roberts J. J., Pascoe J. M.:
Cross-linking of Complementary Strands of DNA in
Mammalian Cells by Antitumor Platinum Compounds
Nature 235, 282 ff. (1972)
83. Roberts J. J.:
Bacterial, Viral, and Tissue Culture Studies in Neutral
Platinum Complexes
in: Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemo-
therapy
ed. by T. A. Connors and J. J. Roberts, Springer
Verlag Berlin - Heidelberg - New York, 79 ff. (1974)

84. Roberts J. J., Friedlos F.:
Quantitative Aspects of the Formation and Loss of DNA
Interstrand Crosslinks in Chinese Hamster Cells
Following Treatment with cis-Diamminedichloroplatinum(II)
(Cisplatin)
Biochim. Biophys. Act. 655, 146 ff. (1981)
85. Roizin-Towle L.:
Studies with cis-Diamminedichloro-Platinum II and
Exogenous Polyamines Using Mammalian Cells in Culture
Br. J. Cancer 43, 378 ff. (1981)
86. Roper P., Drewinko B.:
Comparison of in vitro Methods to Determine Drug-induced
Cell Lethality
Cancer Res. 36, 2182 ff. (1976)
87. Rose W. C., Schurig J. E., Huftalen J. B., Bradner W. T.:
Antitumor Activity and Toxicity of Cisplatin Analogs
Cancer Treat. Rep. 66, 135 ff. (1982)
88. Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T.:
Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by
Electrolysis Products from a Platinum Electrode
Nature 222, 698 ff. (1969)
89. Rosenberg B., Van Camp L., Trosko J. E., Mansour V. H.:
Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumor
Agents
Nature 222, 365 ff. (1969)
90. Rosenberg B., Van Camp L.:
The Successful Regression of Large Solid Sarcoma 180
Tumors by Platinum Compounds
Cancer Res. 30, 1799 ff. (1970)
91. Rosenberg B.:
Possible Mechanisms for the Antitumor Activity of
Platinum Coordination Complexes
Cancer Chemother. Rep. 59, 589 ff. (1975)

92. Rosenberg B.:
Anticancer Activity of cis-Dichlorodiammineplatinum(II)
and Some Relevant Chemistry
Cancer Treat. Rep. 63, 1433 ff. (1979)
93. Rozenzweig M., von Hoff D. D., Slawik M., Muggia F. M.:
Cis-Diamminedichloroplatinum(II): A New Anticancer Drug
Ann. Intern. Med. 86, 803 ff (1977)
94. Salles B., Butour J. L., Lesca C., Macquet J. P.:
cis-Pt(NH₃)₂Cl₂ and trans-Pt(NH₃)₂Cl₂ Inhibit DNA
Synthesis in Cultured L 1210 Leukemia Cells
Biochem. Biophys Res. Commun. 112, 555 ff. (1983)
95. Sekiya S., Iwasawa H., Yamauchi K., Kubota K., Takamizawa H.:
Effects of cis-Dichlorodiammineplatinum(II) on Cloned
Ovarian Adenocarcinoma Cells of the Rat in vitro
Gynecol. Oncol. 12, 14 ff. (1981)
96. Sigdestad C. P., Grdina D. J., Peters L. J., Stutesman J.:
Cell Cycle Phase Preferential Killing of Fibrosarcoma
Tumor Cells by cis DDP or Adriamycin
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. and ASCO 20, 178 f. (1979)
97. Sigdestad C. P., Grdina D. J.:
In vivo Cell Cycle Phase-preferential Killing of Murine
Fibrosarcoma Cells by Cisplatin
Cancer Treat. Rep. 65, 845 ff. (1981)
98. Sodhi A., Aggarwal S. K.:
Effects of cis-Dichlorodiammine Platinum (II) in the
Regression of Sarcoma 180: A Fine Structural Study
J. Natl. Cancer Inst. 53, 85 ff. (1974)
99. Steel G. G.:
Growth Kinetics of Tumors
Clarendon Press, Oxford (1977)

100. Stewart C. C., Ingram M.:
A Method for Counting Phytohemagglutinin Stimulated
Lymphocytes
Blood 29, 628 ff. (1967)
101. Sträuli P.:
Neoplasien
in: Klinische Pathophysiologie, W. Siegenthaler Hrsg.,
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1979, 1080 ff. (1979)
102. Sumner A. T.:
Some Observations on the Mechanisms of Blocking of
Nuclear Staining by Cisplatin
Histochem. J. 14, 283 ff. (1982)
103. Szumiel I., Nias A. H. W.:
The Effect of Combined Treatment with a Platinum Complex
and Ionizing Radiation on Chinese Hamster Ovary Cells
in vitro
- Br. J. Cancer 33, 450 ff. (1976)
104. Takahashi I., Ohnuma T., Kavy S., Bhardwaj S., Holland J. F.:
Interaction of Human Serum Albumin with Anticancer
Agents in vitro
Br. J. Cancer 41, 602 ff. (1981)
105. Teicher B. A., Lazo J. S., Sartorelli A. C.:
Classification of Antineoplastic Agents by their
Selective Toxicities toward Oxygenated and Hypoxic
Tumor Cells
Cancer Res. 41, 73 ff. (1981)
106. Thomson A. J.:
The Interaction of Platinum Compounds with Biological
Molecules
in: Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemo-
therapy, ed. by T. A. Connors and J. J. Roberts,
Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York,
38 ff. (1974)

107. Tofilon P.J., Williams M. E., Barcellos M. H., Deen D. F.:
Comparison of the Sister Chromatid Exchange and Cell
Survival Assay as a Measure of Tumor Cell Sensivity
in vitro to cis-Diamminedichloroplatinum(II)
Cancer Res. 43, 3511 ff. (1983)
108. Veselý J.:
Synergistic Effect of cis-Dichlorodiammineplatinum
and 5-Aza-2'-Deoxycytidine on Mouse Leukemic Cells
in vivo and in vitro
Int. J. Cancer 29, 81 ff. (1982)
109. Weissblum B., Haenssler E.:
Fluorometric Properties of the Benimidazole Derivate
Hoechst 33258, a Fluorescent Probe Specific for AT
Concentration in Chromosomal DNA
Chromosoma 44, 255 ff. (1974)
110. Wennerberg J., Alm P., Björklund A., Killander D.,
Langström E., Tropé C.:
Cell Cycle Perturbations in Heterotransplanted Squamous
Cell Carcinoma of the Head and Neck after Mitomycin C
and Cisplatin Treatment
Int. J. Cancer 33, 213 ff. (1984)
111. Wiencke J. K., Cervenka J., Kennedy B. J., Prlina J.,
Gorlin R.:
Sister-Chromatid Exchange Induction by cis-Platinum/
Adriamycin Cancer Chemotherapy
Mut. Res. 104, 131 ff. (1982)
112. Wolpert-DeFilippes M. K.:
Antitumor Activity of cis-Dichlorodiammineplatinum(II)
Cancer Treat. Rep. 63, 1453 ff. (1979)
113. Yokomori K., Tsuchida Y., Saito S., Yamamoto H., Takakura K.,
Nomura K.:
Synchronization Effect of cis-Dichlorodiammineplatinum
on a Human Neuroblastoma in vitro and in Nude Mice
Gann 74, 902 ff. (1983)

114. Zwelling L. A., Kohn K. W., Ross W. E., Ewig R. A. G.,
Anderson T.:
Kinetics of Formation and Disappearance of a DNA Cross-
linking Effect in Mouse Leukemia L 1210 Cells Treated
with cis- and trans-Diamminedichloroplatinum(II)
Cancer Res. 38, 1762 ff. (1978)
115. Zwelling L. A., Bradley M. O., Sharkey N. A., Anderson T.,
Kohn K. W.:
Mutagenicity, Cytotoxicity and DNA Crosslinking in
V79 Chinese Hamster Cells Treated with cis- and trans-
Pt(II) Diamminedichloride
Mut. Res. 67, 271 ff. (1979)
116. Zwelling L. A., Anderson T., Kohn K. W.:
DNA-Protein and DNA Interstrand Cross-linking by
cis- and trans-Platinum(II) Diamminedichloride in
L 1210 Mouse Leukemia Cells and Relation to Cytotoxicity
Cancer Res. 39, 365 ff. (1979)
117. Zwelling L. A., Kohn K. W.:
Mechanism of Action of cis-Diamminedichloroplatinum(II)
Cancer Treat. Rep. 63, 1439 ff. (1979)
118. Zwelling L. A., Michaels S., Schwartz H., Dobson P. P.,
Kohn K. W.:
DNA Cross-linking as an Indicator of Sensivity and
Resistance of Mouse L 1210 Leukemia Cells to cis-
Diamminedichloroplatinum(II) and L-Phenylalanine
Mustard
Cancer Res. 41, 640 ff. (1981)

Persönliche Daten der Autorin:

Name: Johanna Franziska Maria Heinle

Geburtstag: 31.07.59

Geburtsort: Göggingen jetzt Augsburg

Religion: römisch-katholisch

Familienstand: ledig

Ausbildungsgang:

1965 - 1969 Katholische Volksschule für Mädchen in
Göggingen

1969 - 1978 Neusprachliches Gymnasium der Englischen
Fräulein in Augsburg - Abitur

1978 - 1985 Studium der Medizin an der Ludwig
Maximilians-Universität München

